

Aus dem Center for Cardiovascular Research  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Untersuchung zu Zusammenhängen der humanen plazentaren  
Angiotensin-II-Typ-2 Rezeptor Konzentration mit Markern der  
fetalen Programmierung und der Präeklampsie

Analysis of the relationship between human placental angiotensin  
II type 2 receptor concentration and markers of fetal programming  
and preeclampsia

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Christian Krause

aus Berlin

Datum der Promotion: 23.03.2024



# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	VI
Tabellenverzeichnis.....	VIII
Abkürzungsverzeichnis.....	IX
Zusammenfassung.....	XI
Abstract.....	XIII
1    Einleitung.....	1
1.1    Fetale Programmierung.....	1
1.1.1    Die Barker-Hypothese.....	2
1.1.2    Einflüsse auf den Phänotyp.....	5
1.1.3    Epigenetische Modifikationen.....	7
1.2    Das Renin-Angiotensin-System.....	10
1.2.1    Angiotensin-II-Rezeptoren.....	12
1.2.2    Der Angiotensin-II-Typ2 Rezeptor.....	12
1.2.2.1    Der Angiotensin-II-Typ2 Rezeptor während der embryofetalen Entwicklung.....	16
1.2.3    Präeklampsie.....	18
1.3    Fragestellung.....	20
2    Methoden.....	22
2.1    Kohortenbildung und Datenerfassung.....	22
2.2    Verwendete Chemikalien.....	24
2.3    Verwendete Lösungen.....	25
2.4    Verwendete Geräte.....	28
2.5    Proteinextraktion.....	29
2.6    Western Blot.....	30

2.6.1	Elektrophorese.....	30
2.6.2	Blotten.....	31
2.6.3	Nachweis der Proteine.....	32
2.6.4	Bestimmung der Proteinexpression.....	34
2.7	Untersuchung weiterer Proteine.....	35
2.8	Statistische Analyse.....	36
3	Ergebnisse.....	38
3.1	Ergebnisse der Messungen.....	38
3.1.1	AT2R Analyse.....	38
3.1.2	Charakterisierung der Studienpopulation:.....	40
3.1.2.1	Kinder:.....	40
3.1.2.2	Mütter.....	41
3.2	Assoziationen zwischen Proteinkonzentrationen und Parametern der Studienpopulation.....	42
3.2.1	AT2R und Geburtsgewicht.....	42
3.2.2	AT2R und der Zusammenhang zu weiteren kindlichen Parametern.....	44
3.2.3	AT2R und Gestationsalter.....	45
3.2.4	AT2R-Konzentration und APGAR-Score.....	47
3.2.5	AT2R und Hypoxie / pH-Wert im Blut der Nabelarterie.....	48
3.2.6	Assoziation zu mütterlichen Parametern.....	50
3.2.7	Assoziation zu Symptomen in Zusammenhang mit Präeklampsie.....	53
3.2.7.1	Proteinurie.....	53
3.2.7.2	Hypertonie.....	54
3.2.7.3	Ödeme.....	54
3.2.7.4	Präeklampsie.....	55
3.3	Assoziation mit dem AT1 Rezeptor.....	56
4	Diskussion.....	57

4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse .....	57
4.1.1	AT2R Expression in der Plazenta .....	57
4.1.2	Plazentarer AT2R und Parameter der fetalen Programmierung .....	57
4.1.3	Plazentarer AT2R und maternale Parameter .....	57
4.1.4	Plazentarer AT2R und Symptome in Zusammenhang mit Präeklampsie .....	58
4.2	AT2R in der Plazenta .....	59
4.2.1	Störungen der ATR-Balance .....	60
4.3	Kindliche Parameter, fetale Programmierung .....	64
4.3.1	Geburtsgewicht .....	64
4.3.2	Schwangerschaftsdauer .....	65
4.3.3	pH-Wert im Blut der Umbilicalarterie .....	66
4.4	Mütterliche Parameter, Vorliegen einer Erstgravidität .....	69
4.5	Symptome einer Präeklampsie .....	70
4.6	Schlussbetrachtungen .....	73
4.6.1	Limitationen .....	73
4.6.2	Ausblick .....	74
5	Literaturverzeichnis .....	75
6	Eidesstattliche Versicherung .....	87
7	Lebenslauf .....	88
8	Danksagung .....	90
9	Bescheinigung Statistik .....	91

# Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1</b> Schema der Einflüsse auf die fetale Programmierung.....	4
<b>Abbildung 2</b> Einflüsse auf das kardiovaskuläre Risiko .....	6
<b>Abbildung 3</b> Übersicht über die wichtigsten Transduktionswege des AT2R.....	15
<b>Abbildung 4</b> Schema der Beladung der Gele zur Elektrophorese .....	30
<b>Abbildung 5</b> AT2R-Banden bei 50kDA .....	33
<b>Abbildung 6</b> Aktin-Banden bei 40kDA .....	33
<b>Abbildung 7</b> Boxplot zu den plazentaren Konzentrationen des AT2R in der untersuchten Kohorte angegeben relativ zur Aktinkonzentration .....	38
<b>Abbildung 8</b> Die Verteilung der Häufigkeiten der plazentaren AT2R-Konzentration in der Kohorte relativ zur Aktinkonzentration .....	39
<b>Abbildung 9</b> Zusammenhang zwischen plazentarer AT2R-Konzentration und dem Geburtsgewicht der Kinder .....	42
<b>Abbildung 10</b> Boxplot der plazentaren AT2R-Konzentration bei Neugeborenen mit Untergewicht und mit Normalgewicht .....	43
<b>Abbildung 11</b> Zusammenhang zwischen Gestationsalter in Wochen und der plazentaren AT2R- Konzentration.....	45
<b>Abbildung 12</b> Boxplot zum Zusammenhang zwischen der plazentaren AT2R-Konzentration und Frühgeburtlichkeit.....	46
<b>Abbildung 13</b> Boxplot zum Zusammenhang zwischen postpartaler, plazentarer AT2R-Konzentration und dem Vorliegen einer intrauterinen Hypoxie .....	48
<b>Abbildung 14</b> Boxplot zum Zusammenhang zwischen der postpartalen, plazentaren AT2R- Konzentration und dem pH-Wert im umbilicalarteriellen Blut.....	49

<b>Abbildung 15</b> Boxplot zum Zusammenhang zwischen der plazentaren AT2R-Konzentration und dem Vorliegen einer Erstgravidität .....	51
<b>Abbildung 16</b> Boxplot zum Zusammenhang zwischen dem Vorliegen einer Erstgravidität und dem Alter der Schwangeren.....	52
<b>Abbildung 17</b> Boxplot zum Zusammenhang zwischen dem Vorliegen eines arteriellen Hypertonus und der plazentaren AT2R Konzentration .....	54
<b>Abbildung 18</b> Boxplot Zusammenhang zwischen der plazentaren AT2R Konzentration und dem Vorliegen der Symptome einer Präeklampsie .....	55

# Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1</b> Vergleich der Eigenschaften von AT1R und AT2R.....	13
<b>Tabelle 2</b> Übersicht über die zur Proteinbestimmung verwendeten Chemikalien .....	24
<b>Tabelle 3</b> Zur Proteinbestimmung benutzte Geräte .....	28
<b>Tabelle 4</b> Vergleich von Mittelwerten und Standardabweichung der ermittelten plazentaren Proteine .....	39
<b>Tabelle 5</b> Eigenschaften der Neugeborenen .....	40
<b>Tabelle 6</b> Eigenschaften der Mütter.....	41
<b>Tabelle 7</b> Überprüfung auf Zusammenhänge zwischen der plazentaren AT2R-Konzentration und weiteren erhobenen kindlichen Parametern .....	44
<b>Tabelle 8</b> Untersuchung der plazentaren AT2R-Konzentration und mütterlichen Parametern .....	50
<b>Tabelle 9</b> Zusammenhang zwischen dem Vorliegen einer Proteinurie und dem Zeitpunkt der Schwangerschaft .....	53



# Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin Converting Enzym
ADH	Antidiuretisches Hormon
ANGII	Angiotensin-II
APGAR	pädiatrische Bewertungsskala für Neugeborene
AT1R	Angiotensin-II-Typ-1 Rezeptor
AT2R	Angiotensin-II-Typ-2 Rezeptor
ATR	Angiotensin Rezeptoren
BCA	Bicinchoninsäure
BCL2	B-cell-lymphoma 2
BMI	Boda-Mass-Indexine serum albumin
BSA	bov
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CpG	Cytosin-Guanosin Dinukleotide
DNA	Desoxyrivonukleinsäure
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthetase
ECL Lösung	Enhanced Chemiluminescence Lösung
GR	Glucocorticoid Rezeptoren
H <sub>2</sub> O	Wasser
IDV	integrated density value
INT	Intensitätswert
KONZ	Konzentration
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoff-Synthetasen

PAA	Polyacryl Säure
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDI	Ponderalindex
RAS	Renin-Angiotensi-Aldosteron System
ROS	reactive oxygen species
RNA	Ribonukleinsäure
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSW	Schangerschaftswoche
TBS-T	Trisgepuffertes Saline mit Tween
TEMED	Tertramethylethylendiamin

# Zusammenfassung

Fetale Programmierung ist ein Konzept, welches beschreibt, wie z.B. durch Umwelteinflüsse hervorgerufene Reize während der frühen embryonalen Entwicklung epigenetische Veränderungen hervorrufen können, welche sich später am erwachsenen Organismus manifestieren können. Das Renin-Angiotensin-System ist eines der phylogenetisch ältesten unter den bekannten hormonellen Systemen. Es spielt eine bedeutende Rolle in Zusammenhang mit der Steuerung von Salzausscheidung und Wasserhaushalt sowie der Blutdruckregulation. In verschiedenen Organen und Geweben existieren lokale RAS, so auch in der Plazenta. Der Haupteffektor des RAS ist das Hormon AngiotensinII. Es bindet an spezielle Rezeptoren, von denen mehrere Typen existieren. Der AT2R wird im erwachsenen Organismus nur in geringeren Mengen exprimiert. Er wird vor allem in fetalem Gewebe beobachtet.

In dieser Arbeit wurden Zusammenhänge zwischen dem AT2R in der Plazenta und mütterlichen und kindlichen Parametern untersucht, die bei der fetalen Programmierung und in Zusammenhang mit schwangerschaftsspezifischen Erkrankungen, wie der Präeklampsie eine Rolle spielen.

Es wurden 282 menschliche Plazentaprobe gesammelt und mittels Gelelektrophorese und Westernblott das AT2R-Vorkommen im Plazentagewebe ermittelt. Mit statistischen Analysen wurden Zusammenhänge zwischen der AT2R-Expression der Plazenta und verschiedenen mütterlichen und kindlichen Parametern, welche peripartal erhoben wurden untersucht.

Es ließen sich AT2R in jeder Plazenta nachweisen. Die plazentare AT2R Expression war signifikant höher als die des AT1R. In der vorliegenden Kohorte fand sich kein Zusammenhang zwischen der plazentaren AT2R-Expression und dem Geburtsgewicht der Neugeborenen als dem wichtigsten Surrogatparameter der fetalen Programmierung. Es zeigten sich signifikante Zusammenhänge zwischen der plazentaren AT2R-Expression, dem pH-Wert im umbilicalarteriellen Blut und dem Vorliegen einer intrauterinen Hypoxie. Es wurden signifikante Zusammenhänge zwischen der AT2R-Expression und dem Vorliegen einer Proteinurie der Mütter zu verschiedenen Zeitpunkten der Schwangerschaft gefunden. Auch bei dem gleichzeitigen Vorliegen eines arteriellen Hypertonus und dem Vorliegen einer Proteinurie fand sich ein signifikanter Zusammenhang mit dem plazentaren AT2R. Bei Müttern, bei denen eine Erstgravidität vorlag, zeigte sich eine signifikant höhere AT2R-Expression als bei Müttern, welche zuvor bereits schwanger waren.

Zusammenfassend konnten Anhaltspunkte auf durch AT2R vermittelte Veränderungen des intrauterinen Milieus gezeigt werden, welche auf epigenetische Effekte hinweisen können.

Da es sich bei dieser Studie um eine Assoziationsstudie handelt, die dem Testen und dem Weiterentwickeln von Hypothesen dient, lassen sich hier keine kausalen Zusammenhänge zwischen den plazentaren AT2R und dem Phänotyp darstellen.

## Abstract

Fetal programming describes how environmental influences can cause epigenetic changes during the early embryonic development, which can later manifest in the adult phenotype.

The renin-angiotensin system (RAS) is one of the phylogenetically oldest known hormone systems. It plays an important role in the control of salt excretion and water balance as well as blood pressure regulation. Local RAS exists in various organs and tissues, including the placenta. The main effector hormone of the RAS is angiotensin II. It binds to specific receptors. One of them, the angiotensin II type 2 receptor (AT2R), is expressed only in small amounts in the adult organism. It is mainly found in fetal tissue. In this work, relationships between AT2R in the human placenta and maternal and child parameters that play a role in fetal programming and in connection with pregnancy-specific diseases such as preeclampsia were investigated.

282 human placenta samples were collected and AT2R in placental tissue was determined by gel electrophoresis and Western blotting. Statistical analyses were used to investigate the relationship between the AT2R expression in the placenta and various maternal and child parameters, which had been collected peripartum.

AT2R could be detected in every placenta. The placental AT2R expression was significantly higher than of AT1R. No relationship could be found between placental AT2R and neonatal weight as the most important surrogate parameter of fetal programming. Significant relationship was found between the placental AT2R and the umbilical arterial blood pH as well as the diagnosis of intrauterine hypoxia. As for maternal parameters, significant relationships were found between the AT2R and proteinuria at different time points during pregnancy. Women with simultaneous presence of arterial hypertension and proteinuria had higher placental AT2R expression compared to those without. The AT2R expression was significantly higher in primigravidae mothers.

In summary, this work shows associations between placental AT2R and some maternal and fetal characteristics, which may indicate a role of AT2R in fetal programming.

Since this study is an association study it serves to test and further develop hypotheses. Detection of causal relationships between the placental AT2R and the fetal phenotype remain warrants further studies.

# 1 Einleitung

## 1.1 Fetale Programmierung

Bereits in utero ist der sich entwickelnde menschliche Organismus einer Vielzahl von Reizen ausgesetzt, die seine Entwicklung beeinflussen und auf die er mit spezifischen Anpassungsvorgängen reagieren kann. Als Beispiele gelten hier maternale hormonelle Reize und Reize, die durch das maternale bzw. das Genom des Fetus selbst entstehen sowie Reize die durch maternale Malnutrition oder maternale Hypoxie die Entwicklung beeinflussen können. Es gilt als unbestritten, dass Störungen des intrauterinen Milieus während der pränatalen Entwicklung zu schweren postpartalen Schäden führen können, welche bis ins hohe Alter fortbestehen. Häufig zählen hierzu Erkrankungen, welche sich bereits pränatal manifestieren. Bekannte Beispiele hierfür sind kongenitale Missbildungen der Extremitäten, welche durch die maternale Einnahme des Beruhigungsmittels Thalidomid (Contergan) während der Embryo-genese induziert wurden (1). Ein weiteres Beispiel stellt die Alkoholembryopathie dar, die in Zusammenhang mit maternalem Konsum hoher Dosen Alkohol während der frühen Gravidität auftritt und sich bereits pränatal durch eine Mikrozephalie bemerkbar macht (2). Verschiedene Untersuchungen in den letzten Jahrzehnten legen die Schlussfolgerung nahe, dass es neben diesen früh sichtbaren Erkrankungen auch solche gibt, die zwar ebenfalls angeboren sind, sich aber erst im Verlauf des späteren Lebens manifestieren. Welche also früh postnatal noch „verborgen“ sind.

Vor einigen Jahren entstand unter dem Begriff „developmental origins of health and disease“ eine neue medizinische Teildisziplin, welche sich mit Einflüssen des mütterlichen Organismus und der Umwelt während der pränatalen Entwicklung auf das spätere Entstehen von Krankheiten bei Nachkommen beschäftigt. Mittlerweile konnte in einer Vielzahl von epidemiologischen Studien nachgewiesen werden, dass eine umweltbedingte Malnutrition während der Gravidität einen wichtigen Einfluss auf das embryofetale Wachstum ausübt (3).

Hypothesen, nach denen Auswirkungen von äußeren Reizen an die Folgegenerationen weitergegeben werden können waren zu diesem Zeitpunkt nicht neu. Entsprechende Ideen entstanden bereits im Lauf der letzten 200 Jahre. Als einer der Ersten verband Günter Dörner Anfang der 1970er Jahre an der Berliner Charité entsprechende Konzepte und führte als erster den Begriff der „intrauterinen Programmierung“ als Titel einer Theorie ein, welche krankhafte, langfristig wirkende Effekte aufgrund von hormonellen Einflüssen beschrieb, die bereits pränatal wirksam waren (4). Der

endgültige Begriff „fetale Programmierung“ schließlich wurde durch Hales und Barker geprägt, welche dieses Konzept in den 1990er Jahren weiterentwickelten (5). Der britische Epidemiologe David Barker gilt dabei als der erste Forscher, dem es gelang, Zusammenhänge zwischen der intrauterinen Entwicklung und postnatalen Erkrankungen in einer Studie nachzuweisen. Seine Hypothese des sog. „fetal programming“ geht davon aus, dass bestimmte Stimuli während kritischer Wachstums- und Entwicklungsphasen zu Veränderungen führen können, welche sich nicht direkt postpartal manifestieren, aber ein Leben lang erhalten bleiben und im höheren Alter das Auftreten verschiedener Erkrankungen begünstigen können.

### **1.1.1 Die Barker-Hypothese**

In der zweiten Hälfte des letzten Jahrhunderts waren einige britische Mediziner damit beschäftigt, retrospektiv regionale Unterschiede in der Mortalität von kardiovaskulären Erkrankungen zu untersuchen. *Barker et al.* kamen auf Grund eines beobachteten Zusammenhangs von hoher Säuglingssterblichkeit und einer später vermehrt auftretenden kardiovaskulären Mortalität in einigen Regionen Großbritanniens zu dem Schluss, dass die Ursache dieses Zusammenhangs in widrigen pränatalen Bedingungen liegen könnte.

Die häufigste Ursache für erhöhte Säuglingssterblichkeit am Beginn des 20. Jahrhunderts war ein erniedrigtes Geburtsgewicht. *Barker et al.* konnten in England und Wales mit Hilfe von Geburtsaufzeichnungen aus der Zeit zwischen 1921 und 1928 auf umfangreiche biometrische Marker zurückgreifen und diese mit dem Auftreten von kardiovaskulären Erkrankungen 50-60 Jahre später vergleichen. In Zeiten mit hoher Säuglingssterblichkeit geborene Individuen wiesen im späteren Leben ein erhöhtes Risiko für die ischämische Herzerkrankung auf. In einer weiteren Studie betrachtete man die lokale kardiovaskuläre Mortalität einer Population, die in der Gegend um Herfordshire geboren wurde. Hier zeigte sich, dass Individuen, bei denen zum Zeitpunkt der Geburt ein erniedrigtes Geburtsgewicht gemessen wurde, eine relativ erhöhte Inzidenz für das Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen im Erwachsenenalter aufwiesen. Die kardiovaskuläre Mortalität betrug in der Gruppe der unter-gewichtig Geborenen im Vergleich mit normgewichtiger Geborenen das Zweifache. Die Untersuchungen von *Barker et al.* konnten damit erstmals zeigen, dass eine lokale und zeitliche Beziehung zwischen geringem Geburtsgewicht und erhöhter kardiovaskulärer Mortalität im späteren Alter besteht (6,7).

Barker beschrieb Überlegungen, nach denen bereits pränatal bzw. früh postpartal durch umweltbedingte Reize bestimmte Informationen implantiert und bereits zu diesem Zeitpunkt zu

Veränderungen geführt haben mussten. Diese frühen Veränderungen hätten sich dann im späteren Alter in Form bestimmter Erkrankungen manifestiert. Die nach ihm benannte „Barker Hypothese“ bzw. „hypothesis of developmental origins of adult disease“ beschreibt, dass negative Einflüsse bereits während der intrauterinen Entwicklung permanente Veränderungen von Physiologie und Metabolismus zur Folge haben können, welche in einem erhöhten Risiko für chronische Erkrankungen im Erwachsenenalter münden (8).

Es folgten Studien weiterer Autoren, welche Barkers Beobachtungen ergänzten. *Forsdahl et al.* konnten an einer norwegischen Kohorte einen Zusammenhang zwischen Säuglingssterblichkeit und einem erhöhten Risiko für ischämische Herzkrankheit im späteren Leben nachweisen (9). *Forsen et al.* fanden in einer finnischen Studie an 3302 Männern einen Zusammenhang zwischen niedrigem Geburts- und Plazentagewicht und der Mortalität durch koronare Herzkrankheit (10). Darüber hinaus zeigte sich, dass die beobachteten Zusammenhänge sehr wahrscheinlich unabhängig von anderen Risikofaktoren, wie Rauchen, Übergewicht, der Zugehörigkeit zu bestimmten sozialen Klassen oder Bewegungsmangel waren (11).

In der Folgezeit konnten für weitere postnatale Faktoren, wie z. B. der Glukosetoleranz und Insulinresistenz (12), der Aktivität von Gerinnungsfaktoren (13) und dem Serumcholesterinspiegel (14) Einflüsse von intrauteriner Malnutrition nachgewiesen werden.

Auch der Zeitpunkt, zu dem die intrauterine Mangelversorgung auftritt, steht in Zusammenhang mit dem Bild der später auftretenden Symptome. So fanden *Roseboom et al.*, dass maternale Malnutrition in der frühen Gravidität mit Dyslipidämie und Adipositas der Kinder im höheren Alter einherging. Trat die Malnutrition erst zu einem späteren Zeitpunkt auf war sie eher mit einem erniedrigten Geburtsgewicht der Kinder und einer gestörten Glukosetoleranz im höheren Alter der Kinder assoziiert (15). In weiteren Studien wurden andere biometrische Geburtsmarker auf eine Beziehung zu einem gehäuftem Auftreten bestimmter Erkrankungen im späteren Alter untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Indikatoren wie Kopfumfang und Größe des Neugeborenen ebenfalls mit der Mortalität an kardiovaskulären Erkrankungen im späteren Leben korrelierten (16).

Neben maternaler Malnutrition existieren weitere Faktoren, die sich auf die intrauterine Entwicklung auswirken können. *Benediktsson et al.* konnten im Tierversuch zeigen, dass erhöhte pränatale Glucocorticoidspiegel im Blut mit einem geringeren Geburtsgewicht und erhöhten Blutdruckwerten postnatal in Zusammenhang stehen (17). Auch bei einer pränatalen Exposition von Zytokinen (18), bei einem erhöhten maternalen Anteil an glykolysiertem Hämoglobin (19) oder bei maternaler Anämie (20) fanden sich Hinweise auf ähnliche Zusammenhänge.

Die anfangs von Barker in England beobachtete Beziehung zwischen niedrigem Geburtsgewicht und



dem später gehäuftem Auftreten von kardiovaskulären Erkrankungen konnte in der Folgezeit in vielen anderen Populationen in verschiedenen Ländern nachgewiesen und um weitere Faktoren und Krankheitsbilder erweitert werden. Zusammenfassend liefern diese Studien also deutliche Hinweise darauf, dass sich äußere Einflüsse auf die embryofetale Entwicklung auswirken und dass sich die resultierenden Veränderungen auf verschiedene Art im späteren Lebensalter präsentieren können. Diese Einflüsse treffen dabei intrauterin auf ein komplexes System aus einer Vielzahl an wechselseitigen Interaktionen zwischen maternalem und fetalem Organismus. Neben nutritiven Faktoren spielt die hormonelle Kommunikation und die enzymatische Ausstattung eine bedeutende Rolle für die weitere Entwicklung. Dabei wirken nicht nur maternale, sondern auch plazentare hormonelle Reize auf den fetalen Organismus ein. Die Rolle der Plazenta ist dabei nicht auf eine passive Funktion beschränkt, sondern sie ist in der Lage die intrauterine Entwicklung und das Wachstum aktiv zu beeinflussen.

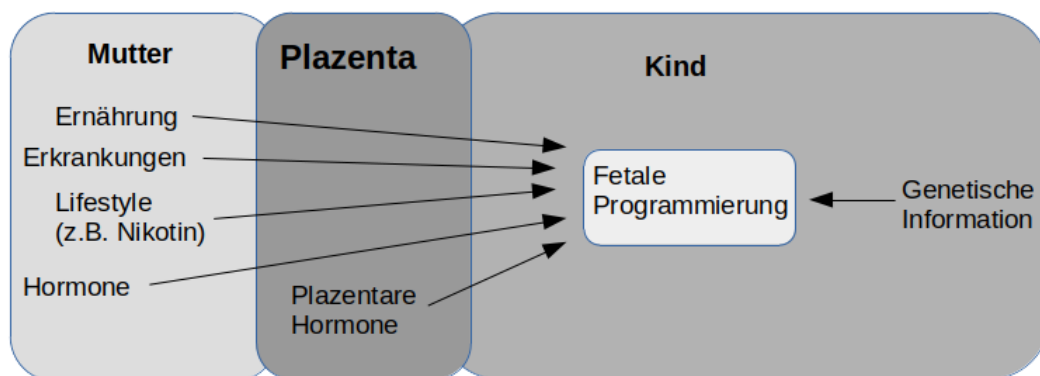


Abbildung 1: Schema der Einflüsse auf die fetale Programmierung

Das embryofetale Wachstum durchläuft pränatal verschiedene Stadien, wobei es sich grob in die Zeit der Organogenese und Zellproliferation, welche zur 8. Woche post conceptionem abgeschlossen ist, und die darauffolgende Periode des Wachstums durch Zellhyperplasie einteilen lässt. Wie bereits beschrieben ließen sich in Studien bereits Zusammenhänge zwischen dem Zeitpunkt der Störung und der Art der beim Adulten auftretenden Symptome darstellen. Der Zeitpunkt, zu dem der Reize auf die embryofetale Entwicklung einwirkt, ist daher ebenfalls von besonderer Bedeutung. Die Theorie der fetalen Programmierung beschreibt in diesem Zusammenhang pränatal kritische Entwicklungsphasen, während derer der embryofetale Organismus in erhöhtem Maße anfällig für umweltbedingte Störungen, wie Nährstoffmangel oder Veränderungen im Hormonhaushalt, ist. Diese Störungen können somit bereits in einem frühzeitigen Entwicklungsstadium die spätere Funktionsweise von Organen und Organsystemen beeinflussen. Ihr Einfluss kann hierdurch bis ins Erwachsenenalter

bestehen bleiben und nun zu chronischen Erkrankungen wie Übergewicht und Bluthochdruck führen. Diese dauerhaften Veränderungen der Organfunktionen stellen einen Entwicklungsweg dar, welcher sich im Rahmen der durch die genetische Information vorgegebenen Möglichkeiten vollzieht.

### **1.1.2 Einflüsse auf den Phänotyp**

Barkers Theorie des fetalen Ursprungs bestimmter Erkrankungen setzt voraus, dass die Entwicklung des Organismus einer gewissen Plastizität unterliegt und innerhalb eines bestimmten Spektrums, welches vom Genotyp vorgegeben wird, variieren kann. Das Wachstum im Uterus wird auf der einen Seite zwar grundsätzlich vom Genom vorgegeben, welches als eine Art Grundbauplan einen bestimmten Kontext bietet, innerhalb dessen die tatsächliche Entwicklung abläuft, auf der anderen Seite bestimmen äußere Einflüsse, wie weit diese von der vom Genom vorgegebenen Entwicklung abweicht. Sie spielen somit für das perinatal erreichte Gewicht und die Größe ebenfalls eine bedeutende Rolle und gestalten somit den resultierenden Phänotyp (21). Dieser stellt hierbei nach Barker jenen Entwicklungsweg dar, welcher den Organismus am besten auf die erwartete postnatale Umwelt vorbereitet. Dieses Prinzip gewährleistet in einer Art von Rangfolge die Bevorzugung wichtiger Organsysteme, um diese vor den Auswirkungen sowohl einer prä- als auch einer postpartalen Mangelsituation so gut wie möglich zu bewahren. Ein Beispiel hierfür bietet das Konzept des „brain sparing“: Hier kann der Organismus des Fötus, welcher innerhalb bestimmter kritischer Zeiträume im Uterus eine Mangelversorgung erfährt, darauf mit Umbauvorgängen an verschiedenen Organsystemen reagieren. Diese Umbauvorgänge sollen eine möglichst geringe negative Beeinflussung der Entwicklung wichtiger Strukturen, in diesem Fall der des Nervensystems ermöglichen (22). Barker vermutete die Ursache des Zusammenhangs zwischen späterer Insulinresistenz und verringerte Muskelmasse in einer intrauterinen Abhängigkeit der Entwicklungen von Nerven- und Muskelgewebe im Zustand einer intrauterinen Malnutrition. Die möglichst unbeeinträchtigte zerebrale Entwicklung dieses Phänotyps werde auf Kosten des Muskelwachstums ermöglicht. Die aus pränataler Malnutrition resultierende Verringerung der Muskelmasse manifestiere sich postnatal vor allem durch ein niedriges Geburtsgewicht (23).

An diesem Beispiel zeigt sich, dass ein bestimmter Genotyp nicht zwingend zu einem determinierten Phänotyp führen muss. Eher ist der Genotyp in der Lage, je nachdem welchen Einflüssen der sich entwickelnde Organismus ausgesetzt ist, einen von vielen verschiedenen möglichen Phänotypen zu produzieren. Durch eine Vielzahl an möglichen Phänotypen wiederum kann sich der Organismus optimal an seine Umgebung anpassen und sich somit bestmöglich auf die erwarteten postnatalen Gegebenheiten vorbereiten. Barkers Hypothesen deuten darauf hin, dass die Plastizität dieser Entwicklung einen wesentlich größeren Spielraum bietet, als bis dahin angenommen wurde.

Diese Überlegungen führten Barker und Hales zur „thrifty phenotype hypothesis“: Durch Anpassungsvorgänge ist der fetale Organismus hier in der Lage sich auf eine nährstoffarme postpartale Umwelt vorzubereiten. Von vielen möglichen Phänotypen würden diese Adaptionsvorgänge in einer nährstoffarmen Umgebung intrauterin in einem „sparsamen Phänotyp“ resultieren, der es dem Kind postnatal ermöglichen soll, mit wenig Nahrung auszukommen und den Organismus zu einer optimalen Nutzung der ihm zur Verfügung stehenden Ressourcen befähigen soll.

Es ist wahrscheinlich, dass auch wenn diese intrauterinen Modifizierungen postnatal in einer nährstoffarmen Umgebung von Vorteil sein können, sie dennoch in der Lage sind sich in einer nährstoffreichen Umgebung negativ auszuwirken, indem sie ein Auftreten von Diabetes mellitus Typ 2 und dessen Folgen begünstigen können (23). Die intrauterinen Anpassungsvorgänge würden somit unter bestimmten Bedingungen die Anfälligkeit des adulten Organismus für das Auftreten bestimmter Krankheiten erhöhen.

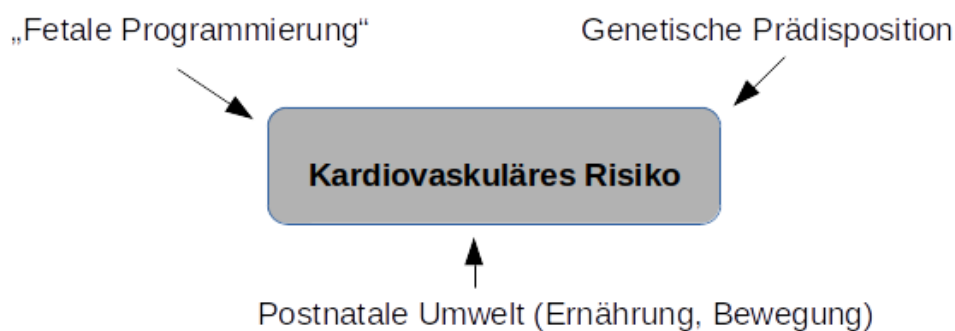


Abbildung 2: Einflüsse auf das kardiovaskuläre Risiko

Dies trifft dann zu, wenn die postnatale Umwelt nicht den pränatalen Erwartungen entspricht, wenn also ein Mismatch zwischen diesen entsteht. Daraus folgt, dass die beobachteten Zusammenhänge zwischen eingeschränktem prä- und postnatalem Wachstum einerseits und dem gehäuften Auftreten von Diabetes Mellitus Typ 2 und metabolischem Syndrom im Erwachsenenalter andererseits, ihre Ursache in einer Malnutrition im frühen Leben und in daraus folgenden Abweichungen von den erwarteten postnatalen Umweltbedingungen haben, wenn postnatal ein Überangebot an Nahrung zur Verfügung steht.

### 1.1.3 Epigenetische Modifikationen

Die Theorie der fetalen Programmierung wird derzeit durch eine Vielzahl an Publikationen gestützt. Auch das Verständnis der molekularen Mechanismen, welche in Frage kommen, diese frühzeitigen Anpassungsvorgänge umzusetzen konnte in den letzten Jahrzehnten deutlich erweitert werden. Eine wichtige Rolle wird in diesem Zusammenhang der epigenetischen Modifikation der DNA zugeschrieben.

Epigenetische Modifikationen sind vererbare Änderungen von Genexpression und -funktion, welche nicht durch entsprechende Veränderungen in der DNA-Sequenz selbst erklärt werden können (24). Durch die Regulierung der Expression bestimmter Gene zu festgelegten Zeitpunkten steuern sie die Differenzierung der einzelnen Zellen, welche anschließend z.B. innerhalb eines Zellverbandes bestimmte Funktionen ausüben können. Sie bilden den Anteil innerhalb der DNA, in dem sich differenzierende Zellen unterscheiden. Epigenetische Modifikationen umfassen unter anderem DNA-Methylierung, kovalente Histonmodifikationen und RNA-Silencing.

Die DNA-Methylierung ist der in diesem Zusammenhang am besten untersuchte epigenetische Prozess, welcher den DNA-Strang modifiziert, ohne in die DNA-Sequenz selbst einzugreifen. Es ist ein phylogenetisch alter Vorgang, der hauptsächlich der Inaktivierung von Fremd-DNA diene. Bei der DNA-Methylierung spielen Cytosin-Guanosin Dinukleotide (CpG), die sich an den 5' Promotorregionen bestimmter Gene befinden und auch als CpG Inseln bezeichnet werden eine besondere Rolle. Sie enthalten Cytosinbasen, welche sich durch die DNA-Methyltransferasen 3a und 3b methylieren lassen. Die RNA-Polymerase, welche die Herstellung von Ribokleinsäuren katalysiert, lagert sich für diesen Vorgang an ihre Bindungsstellen an. Dies ist allerdings nur dann möglich, wenn die CpG Dinukleotide im Promoter unmethyliert sind. Die Methylierung verhindert die Transkription der entsprechenden Gene und inaktiviert sie (25–27).

Da die Methylierung an beiden Strängen der DNA stattfindet und der DNA-Methyltransferase 1 hemimethylierte DNA als Substrat gilt, wird sie normalerweise bei der mitotischen Zellteilung auch an die Tochterzellen weitergegeben (28). Das Ausmaß an neu stattfindenden DNA-Methylierungen ist besonders im Genom der Zellen während der frühen Embryonalphase stark ausgeprägt. Mit fortschreitender Differenzierung der verschiedenen Gewebe nimmt ihre Aktivität dann immer weiter ab (29). In späteren Lebensphasen hat neu stattfindende DNA-Methylierung kaum noch eine Bedeutung. In Ausnahmefällen kann es jedoch auch im höheren Lebensalter noch zu Phasen mit einer steigenden Rate an DNA-Methylierungen kommen. Dies ist bei z.B. bei pathologischen Veränderungen wie Krebserkrankungen der Fall (30).

Verschiedene Studien konnten bereits konkrete Beispiele für DNA-Methylierung aufzeigen. *Heijmans et al.* waren eine der ersten, welche in einer Untersuchung zeigen konnten, dass vorübergehende Umweltbedingungen in der frühen Entwicklung zu epigenetischen Modifizierungen führen können, welche im späteren Leben persistieren und sich anhand von veränderten DNA-Methylierungsmustern nachweisen lassen. Sie untersuchten Individuen, welche zum Ende des zweiten Weltkrieges in Holland früh pränatal einer zeitlich eng begrenzten Hungerperiode ausgesetzt waren und konnten 60 Jahre später im Vergleich mit gleichgeschlechtlichen Zwillingen, welche intrauterin keiner entsprechenden Malnutrition ausgesetzt waren eine geringere Methylierung bestimmter CpG Dinukleotide im Gen des insulin-like growth factor II, eines wichtigen Wachstumsfaktors nachweisen (31). Weitere Hinweise lieferte eine retrospektive Studie von *Radtke et al.* Sie untersuchten den Methylierungsstatus bestimmter Glucocorticoid Rezeptoren (GR) von Müttern und deren Nachkommen 10-19 Jahre postnatal anhand von methylierten CpG Inseln. Sie kombinierten die Ergebnisse mit Befragungen zu bestimmten Formen maternalen Stresses während der Schwangerschaft. Es war bereits bekannt, dass pränatal auftretender maternaler Stress die psychische Funktion der Nachkommen beeinflussen kann. Vorhergehende Versuche legten die Vermutung nahe, dass hierfür u.a. die epigenetische Programmierung von Genen der GR eine Rolle spielte. *Radtke et al.* fanden bei den Nachkommen der Mütter, die besonderem Stress während der Schwangerschaft ausgesetzt waren, eine signifikant erhöhte Rate an methylierten GR. Bei den Müttern selbst fand sich diesbezüglich kein signifikanter Zusammenhang. Das sind Hinweise darauf, dass Folgen pränatalen Stresses über eine Methylierung von CpG Inseln des GR an die Nachkommen weitergegeben werden können (32).

Epigenetische Modifikationen können die Expression bestimmter Gene abhängig von Umwelteinflüssen steuern und somit zu Phänotypen führen, welche sich unter anderen Bedingungen nicht entwickelt hätten. Die eigentliche Erbinformation bleibt von solchen Veränderungen unberührt. Im Gegensatz zur DNA, deren Information sehr stabil ist, und sich über das gesamte Leben hinweg nicht verändert, kann die epigenetische Modifikation Informationen von frühzeitig abgelaufenen Ereignissen und Umwelteinflüssen bewahren und das Individuum auf bestimmte zukünftige Ereignisse vorbereiten. Darüber hinaus ist die epigenetische Modifikation reversibel.

Die Exposition besonderer, prägender Umweltbedingungen z.B. während der fetalen Entwicklung oder innerhalb der ersten Lebensjahre kann dabei eine epigenetische Markierung setzen. Da diese Markierungen über viele Zellgenerationen hinweg weitervererbt werden können, ist es wahrscheinlich, dass sie langfristige Veränderungen der Genexpression induzieren und den Phänotyp mitgestalten können. Dies kann im Rahmen der Anpassung an widrige Umweltbedingungen einen großen Vorteil darstellen. Allerdings können epigenetische Modifikationen im späteren Leben zu

verschiedenen Erkrankungen führen. Diese Art von Krankheitsentstehung wurde unter dem Begriff „developmental origin of health and disease hypothesis“ beschrieben (33,34). Die Deregulation bestimmter epigenetischer Mechanismen kann darüber hinaus verschiedenste Erkrankungen, wie z.B. Krebserkrankungen zur Folge haben (35).

Auch hormonelle Systeme können durch DNA-Methylierung beeinflusst werden und sind bereits während früher Entwicklungsphasen „programmierbar“. Ein Beispiel für ein solches System ist das Renin-Angiotensin-System (RAS). *Rangel et al.* z. B. untersuchten den Methylierungsstatus von Promotorgen des Angiotensin Converting Enzyms (ACE), einem wichtigen Bestandteil des RAS. Sie konnten bei 6- bis 12-Jährigen, untergewichtig geborenen Kindern eine signifikante Hypomethylierung im Vergleich mit normalgewichtig geborenen Kindern zeigen. Zusätzlich fanden sie eine signifikant inverse Korrelation zwischen dem Ausmaß der DNA-Methylierung und den Parametern ACE-Aktivität und systolischer Blutdruck (36). *Bogdarina et al.* konnten im Tierversuch anhand maternalen Proteinrestriktion bei Ratten in der Folgegeneration eine erhöhte Expression des Angiotensin I Rezeptors (AT1R), einem weiteren wichtigen Bestandteil des RAS, sowie eine geringere Methylierung in dessen Promotorgen zeigen (37).

## 1.2 Das Renin-Angiotensin-System

Das RAS ist eines der phylogenetisch ältesten unter den bekannten hormonellen Systemen. Es spielt eine bedeutende Rolle in Zusammenhang mit der Steuerung von Salzausscheidung und Wasserhaushalt sowie der Blutdruckregulation (38). Die Geschichte der Entdeckung seiner Komponenten und Analyse seiner zahlreichen Funktionen reicht mehr als 150 Jahre weit zurück als Richard Bright 1836 erste Hinweise auf ein System beschrieb, welches Nieren und Herz verband. Gegen Ende des 19. Jahrhunderts gelang es Robert Tigerstedt und Per Bergmann eine Substanz zu extrahieren, welche offenbar vasopressorische Eigenschaften besaß. Da diese Substanz aus einer Kaninchenniere gewonnen wurde, nannte man sie Renin (39).

Mit der Zeit erkannte man, dass Renin nur ein Teil eines komplexen Systems von Hormonen und Enzymen ist dessen Ausgangssubstanz das Alpha-Glycopeptid Angiotensinogen darstellt (40,41), welches von der Leber sezerniert wird. Angiotensinogen ist die Vorstufe der aktiven Komponenten dieses Systems, welche im Blutkreislauf inaktiv bleibt und durch das von Tigerstedt und Bergmann entdeckte Enzym Renin in Angiotensin I gespalten wird. Renin wird vom juxtaglomerulären Apparat der Niere sezerniert (40,42). Bei Angiotensin I handelt es sich um ein Dekapeptid und ebenfalls um eine inaktive Vorstufe. In einem weiteren Schritt wird das Angiotensin I zu Angiotensin II (ANGII), einem Oktapeptid aktiviert. Die Aktivierung geschieht durch das Angiotensin Converting Enzyme (ACE), einer membrangebundenen Metalloproteinase, welche wiederum vornehmlich an der Oberfläche von Endothelialzellen des Lungenkreislaufs gebildet wird (40). ANGIID stellt in diesem System den Haupteffektor dar, welcher seine Wirkung an speziellen Rezeptoren entfaltet. Hierüber kann u. a. der Tonus glatter Gefäßmuskulatur beeinflusst werden, was eine Rolle bei der Blutdruckregulation und Nierendurchblutung spielt (41). Auch die Freisetzung weiterer Hormone kann hierdurch beeinflusst werden. In den Nebennieren bewirkt es z. B. eine vermehrte Freisetzung von Aldosteron, dessen wichtigste Aufgabe die Rückresorption von Wasser in den Sammelrohren der Nieren im Rahmen der Blutdruckregulation ist. In der Hypophyse stimuliert es die Freisetzung des Antidiuretischen Hormons (ADH), welches ebenfalls eine Reabsorption von Wasser in den Sammelrohren der Nieren bewirkt. In hohen Dosen führt es zu einer Gefäßverengung. Des Weiteren steigert ANGIID in einem Rückkopplungskreislauf die Angiotensinausschüttung, während es die Freisetzung von Renin hemmt (43–45).

Das RAS ist in der Lage, auf verschiedene Störungen angemessen und in abgestuften Zeiträumen zu reagieren. Einige der Wirkungen des ANGIID, wie Vasokonstriktion und Ausschüttung von Aldosteron stellen sich sofort, d.h. in Sekunden bis Minuten ein. Dadurch kann der Organismus auf plötzliche Störungen, wie z.B. Blutungen oder Dehydration kurzfristig reagieren, um hierdurch den

Blutkreislauf zu unterstützen. Andere Wirkungen, wie das Wachstum von Gefäßen, ventrikuläre Hypertrophie oder die Vasokonstriktion durch sehr geringe Mengen an Aldosteron wiederum entfalten sich über Zeiträume von Tagen oder Wochen (45,46).

Im Lauf seiner weiterführenden wissenschaftlichen Untersuchung gewann das Modell des RAS immer mehr an Komplexität. Spezifische Untersuchungen zur Verteilung der Angiotensin-II-Rezeptoren (ATR) zeigten, dass es sich bei ANGII um ein Hormon handelt, welches parakrine und autokrine Funktionen besitzt und in der Lage ist Zell- und Gewebewachstum zu steuern (45,47). Seine wichtigsten Komponenten wurden auch innerhalb verschiedener Organe bestimmt, was einen Hinweis auf die Existenz verschiedener lokaler RAS lieferte (48). Spezifische Bindungsstellen für ANGII befinden sich auch an Lokalisationen, welche nicht zu den klassischen Wirkorten des RAS gehören. Hierzu zählen z.B. die Haut, Monozyten, die Harnblase, die Ovarien, Spermien (49). Der Nachweis einer signifikanten Angiotensinproduktion in der humanen Dezidua sowie die Expression von ATR in dezidualen Stromazellen während des ersten Trimesters der Gravidität lieferten darüber hinaus wichtige Hinweise auf eine Rolle des RAS bei der Regulation der dezidualen und plazentaren Entwicklung und Funktion (50). Auch innerhalb der Plazenta konnten ATR, Angiotensinogen, ANGII, Renin und ACE nachgewiesen werden. Der Gefäßtonus wird hier aufgrund fehlender Innervation ausschließlich von löslichen Komponenten des RAS sowie NO reguliert (51). Die Erkenntnis, dass ANGII in der Plazenta selbst exprimiert wird, unterstützt das Konzept eines lokalen plazentaren RAS (52,53) und deutet darauf hin, dass das RAS hier bei pränatalen Anpassungsvorgängen sowie hinsichtlich der Regulierung von maternalem und fetalem Salz- Wasserhaushalt eine wichtige Rolle spielt (38). Das plazentare RAS ist von Beginn der Plazentation an aktiv. Mit der Plazenta ist es Bestandteil des fetalen Teils des fetoplazentaren Überganges dessen maternaler Anteil von Dezidua und dem dezidualen RAS gebildet wird. Faktoren wie Östrogen und Progesteron, welche z.B. die Dezidualisation stimulieren, üben einen regulierenden Einfluss auf das lokale RAS der Plazenta aus (54). Auch im maternalen Serum konnte ein Zusammenhang zwischen der Östradiol-, der Östrogen- und der Reninkonzentration während der Schwangerschaft nachgewiesen werden (55). Die Beteiligung von ANGII an der Regulation von synzytialen Transportvorgängen sowie dem Eindringen des Trophoblasten in das Uterusepithel (50) deutet auf weitere pränatal bedeutende Funktionen des RAS hin.

Weitere extrarenale RASs, zu denen z.B. die der Ovarien und des Uterus zählen, spielen eine wichtige Rolle bei der Ovulation, der Implantation, der Plazentation sowie der Entwicklung des uteroplazentaren und umbilicoplazentaren Kreislaufs. Darüber hinaus beeinflussen sie die Aktivität des maternalen RAS und somit die maternale kardiovaskuläre und renale Funktion (38).



### **1.2.1 Angiotensin-II-Rezeptoren**

Insbesondere Untersuchungen des Vorkommens und der Verteilung seiner Rezeptoren lieferten einen bedeutenden Beitrag zum besseren Verständnis des RAS. Die Identifizierung und Lokalisierung eines ANGII-Rezeptors gelang erstmals zu Ende der 1960er Jahre mittels des Nachweises der Bindung von radioaktiv markierten Antikörpern im Radioimmunoassay (56,57). In den folgenden Jahren beobachtete man einige Unterschiede in der Funktionsweise der ATR. Physiologische Untersuchungen in den 1970er und 80er Jahren mit ANGII-Antagonisten, welche sich leicht in ihrer Struktur unterschieden, legten die Existenz mehrerer ATR-Subtypen nahe (58–60). Der AngiotensinII-Typ1-Rezeptor (AT1R) ist der beim Erwachsenen am häufigsten anzutreffende ATR-Typ. Es ist auch derjenige Rezeptortyp, der die wesentlichen beobachteten Wirkungen im adulten Organismus vermittelt (61). Hierzu zählen die Steuerung des Gefäßtonus, Hormonsekretion, Wachstum von Gewebe und die Regulierung von neuronaler Aktivität (62,63).

### **1.2.2 Der Angiotensin-II-Typ2 Rezeptor**

Der AngiotensinII-Typ2 Rezeptor (AT2R), welcher in frühen Versuchen durch sein Bindungsverhalten nachgewiesen wurde, besitzt eine ähnliche Affinität für ANGII, unterscheidet sich jedoch strukturell und funktionell vom AT1R. Der humane AT2R ist in einem Gen im X-Chromosom (Xq22-q2) kodiert und gleicht in seiner Gensequenz lediglich zu 34% dem AT1R (64). Wie der AT1R gehört er zu einer 7-transmembranären Rezeptorsuperfamilie. Sein Molekulargewicht beträgt 41 kDa und er besteht aus 363 Aminosäuren (65). Der humane AT2R gleicht dem von Maus und Ratte zu 92% (66).

Der AT2R wird in großen Mengen in fetalem Gewebe exprimiert. Postnatal sinkt seine Expressionsrate in den meisten Geweben sehr schnell bis an die Bestimmbarkeitsgrenze ab. In der Haut z.B. ist seine Expression nach kurzer Zeit nicht mehr belegbar. Im Gegensatz dazu lässt er sich in einigen anderen Gewebearten ein Leben lang nachweisen, wenn auch in geringerem Maße. Hierzu zählen das Nebennierenmark, die Herzmuskulatur, die Ovarien sowie einige Regionen des Gehirns. Auch im adulten humanen Uterus wird er weiter exprimiert. Während der Gravidität wurde darüber hinaus ein vorübergehendes Abfallen der Expression im Uterus beobachtet. Die gesunkene Expressionsrate steigt postpartal wieder auf präkonzeptionelle Werte an. Dieses Verhalten liefert Hinweise auf eine Steuerung der Expression (62).

Die Funktionen, die der AT2R ausübt sind in vielen beobachteten Fällen zu denen des AT1R gegensätzlich. Die Effekte, die durch ihn vermittelt werden, unterstützen überwiegend

gewebeprotektive Mechanismen. Hierzu zählen antiinflammatorische, antifibrotische, antihypertrophe und neuroprotektive Effekte (67,68). Er ist in Entwicklungsprozesse involviert und wirkt hierbei in erster Linie inhibitorisch auf das Zellwachstum und fördert die Apoptose. Durch vasodilatative Effekte spielt der AT2R eine Rolle bei der Blutdruckregulation. Er fördert die Natriurese und beeinflusst neuronale Aktivitäten. In adultem Gewebe wird im Rahmen von pathologischen Veränderungen bei denen ein Geweberemodeling stattfindet oder bei denen inflammatorische Vorgänge ablaufen eine verstärkte Expression beobachtet. Hierzu sind Veränderungen wie Hypertonus, Atherosklerose, Herzkrankheit, Myokardinfarkt, ischämische Ereignisse oder Diabetes mellitus zu zählen. Eine Verringerung der Expression des AT2R wurde bei erhöhter Aktivität von Glucocorticoiden, Wachstumsfaktoren und des AT1R beobachtet (69).

<b>AT1R</b>	<b>AT2R</b>
vasokonstriktorisch anti-natriuretisch	vasodilatatorisch natriuretisch
pro-inflammatorisch	anti-inflammatorisch
pro-fibrotisch	anti-fibrotisch
pro-hypertroph	anti-hypertroph pro-apoptotisch
pro proliferativ	anti-proliferativ
	neuroprotektorisch
Aldosteron, Vasopressin Sekretion Norepinephrin, Epinephrin Sekretion	NO-Produktion
	Kollagen-Synthese

Tabelle 1: Vergleich der Eigenschaften von AT1R und AT2R

Der AT2R ist einerseits in der Lage direkten Einfluss auf die Funktion verschiedener anderer Membranproteine und Kanäle auszuüben. Hierzu zählen z.B. Rezeptoren für Wachstumsfaktoren sowie Kalium- und Calciumkanäle (70). Er ist in der Lage mit dem AT1R in direkter Bindung ein Heterodimer zu bilden und damit dessen Aktivierung zu inhibieren (71).

Darüber hinaus gehört der AT2R, wie der AT1R zur Gruppe der G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Er aktiviert eine G-Protein gekoppelte Signalkaskade, durch die er seine Wirkung auf drei verschiedenen Transduktionswegen vermitteln kann:

1. Aktivierung der Phospholipase A2,
2. Aktivierung der Serin/ Threonin Phosphatase und
3. Aktivierung des Bradykinin Rezeptors (69).

Die durch die Aktivierung der Phospholipase A2 ausgelöste Kaskade (1.) mündet über die Bildung von Arachidonsäure, der Proteinphosphatase A2 und die Regulation von Kaliumkanälen in einer Zellhyperpolarisation und einer verminderten Erregbarkeit der Zelle. Dies scheint ein wichtiger Effekt hinsichtlich der Dämpfung sympathischer Aktivität zu sein (72).

Die Aktivierung der Serin/ Threonin Phosphatase (2.) steigert die Aktivität der extracellular-signal-regulated Kinase. Diese wiederum reguliert zelluläre Prozesse, wie z. B. die Proliferation und die Zelldifferenzierung. Hierüber beeinflusst der AT2R apoptotische und antiproliferative Vorgänge (73).

Der AT2R ist in der Lage mit dem Bradykininrezeptor ein Heterodimer (3.) zu bilden, wodurch er wiederum Einfluss auf die Aktivierung der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthetase (eNOS) ausüben und damit vasodilatative Einflüsse fördern kann (69).

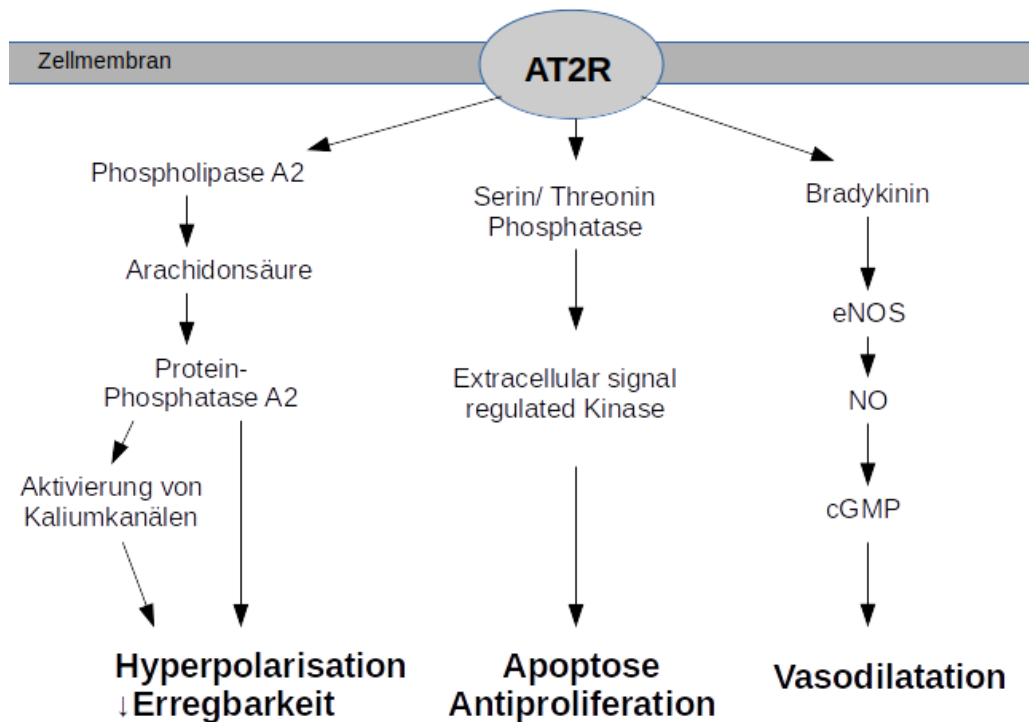


Abbildung 3: Übersicht über die wichtigsten Transduktionswege des AT2R

eNOS katalysiert die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) aus der Aminosäure L-Arginin. Es wird in Endothelzellen von Blutgefäßen gebildet und stellt die dominierende Isoform der Stickstoff-Synthetasen (NOS) dar. NO wiederum stimuliert die lösliche Guanylylcyclase und erhöht dadurch die Konzentration an cyclischem Guanosinmonophosphat (cGMP) in glatter Muskulatur, wie der Gefäßmuskulatur. Auf die glatte Muskulatur wirkt es relaxierend. Somit ist NO in der Lage, an allen Blutgefäßen eine Vasodilatation herbeizuführen (74). NO gilt allgemein als gefäßschützender Faktor. Es besitzt Eigenschaften, die der Entstehung von Atherosklerose entgegenwirken können. Hierzu zählen die Reduktion der Adhäsionsfähigkeit von Leukozyten an Gefäßwände, Hemmung der Oxidation von Low Density Lipoprotein, Unterdrückung der Teilungsfähigkeit glatter Gefäßmuskelzellen und der Hemmung der Thrombozytenaggregation (75).

### **1.2.2.1 Der Angiotensin-II-Typ2 Rezeptor während der embryofetalen Entwicklung**

Über die genaue Rolle des AT2R während der embryofetalen Phase ist noch recht wenig bekannt. Es ließen sich jedoch deutliche Hinweise finden, die nahelegen, dass der Rezeptor in Entwicklungsprozesse involviert ist und bestimmte, für die pränatale Periode bedeutende Funktionen ausübt. Der AT2R wird bevorzugt in fetalem Gewebe exprimiert (76). Es konnte gezeigt werden, dass die Expression des AT2R in der Fetalzeit die des AT1R um ein Vielfaches übersteigt. In der fetalen Niere z. B. wird der AT2R vor Allem in unreifen Glomeruli, kortikalen und medullären Tubuli und interstitiellen Zellen exprimiert. Innerhalb von nur wenigen Tagen postpartal sinkt hier die AT2R-Expression rasch bis auf ein sehr niedriges Niveau ab. In vielen Geweben bleibt der AT2R allerdings weiterhin nachweisbar, in den Nieren z. B. bevorzugt in glomerulären Epithelzellen, kortikalen Tubuli und interstitiellen Zellen (64,77). Im adulten Organismus ließ sich nachweisen, dass der AT2R weiterhin bevorzugt in Gewebe mit stattfindender mesenchymaler Differenzierung exprimiert wird (75,78).

Der AT2R scheint in sich differenzierendem Gewebe eine wichtige Funktion bei der Kontrolle von Apoptosemechanismen auszuüben. Dies deutet auf eine Rolle bei der Steuerung des Gewebewachstums hin. Es konnte gezeigt werden, dass der AT2R vor allem der Lage ist, durch die Unterdrückung der Aktivierung des Membranproteins BCL2 Apoptose in bestimmten Geweben zu induzieren (79). Zusätzlich sah man in anderen Untersuchungen, dass der AT2R zum Teil auch antiapoptotische und gewebeprotective Funktionen vermitteln kann (80).

Da der AT2R auch in der humanen Plazenta gebildet wird liegt die Vermutung eines Einflusses des AT2R auf die plazentare Funktion und das fetale Wachstum nahe. Untersuchungen zu seiner Verteilung zeigten, dass sich die höchsten Expressionen von AT2R vorwiegend in den Zellen der Chorionzotten und der Hofbauer-Zellen finden lassen (50). *Williams et al.* bestimmten die höchste plazentare Expression an AT2R während der frühen Gravidität. Durch seine Rolle bei der Regulation von Apoptose, Zellproliferation und Angiogenese könnte er während dieser Periode eine wichtige Funktion bei der Plazentation spielen. Im weiteren Verlauf der Gravidität nimmt die Expression des Proteins immer weiter ab und erreicht ihre geringsten Werte spät präpartal (54).

Im Tiermodell fanden sich Hinweise darauf, dass der AT2R während der Tragzeit eine Rolle bei der Regulierung des uteroplazentaren Blutflusses spielt. Bis zur 20. humanen Gestationswoche wurde ein durch Östrogen gesteuerter Anstieg der Angiotensinogenproduktion beobachtet, welcher eine Aktivierung von Renin und AngiotensinII und somit des gesamten RAS zur Folge hat. *Burrell et al.* untersuchten die ATR-Expression in der Arteria uterina von trächtigen Schafen. Sie fanden hier im

Vergleich zu nicht trächtigen Versuchstieren eine gesteigerte Expression von AT2R (81). Da AT2R vasodilatatorische Wirkungen über Nitrooxid und Bradykinin vermitteln kann wurde vermutet, dass die gesteigerte Expression von AT2R in der Arteria uterina der gesteigerten systemischen RAS-Aktivität entgegenwirkt, indem sie hier eine Verminderung der Vasokonstriktionsbereitschaft bei einer erhöhten ANGII Konzentration begünstigt, um damit einen hohen uteroplazentaren Blutfluss zu gewährleisten (38). Nach *Lumbers et al.* wird diese Vermutung durch mehrere Beobachtungen gestützt: durch eine kurzfristige ANGII-Infusion wurde der uteroplazentare Blutfluss bei trächtigen Schafen nicht im Sinne einer Vasokonstriktion beeinflusst. Erst länger andauernde ANGII Infusionen (16-20h) führten zu einer Verminderung des Blutflusses mit der Folge einer fetalen Hypoxie (82). Des Weiteren beobachtete man bei genetisch veränderten AT2R-defizienten Mäusen einen erhöhten Blutdruck im dritten Trimester der Tragzeit. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Gabe eines AT2R Antagonisten den Blutdruckabfall in der Mitte der Tragzeit von trächtigen AT1aR -/- Mäusen vermindert (38). *Lumbers et al.* werteten diese Befunde als Hinweis auf eine Rolle des AT2R bei der Regulation von maternalem Blutdruck und uteroplazentarem Blutfluss im Tiermodell. Die Autoren sind der Meinung, dass es wahrscheinlich sei, dass sowohl die systemische als auch die Expression des AT2R im uteroplazentaren Gefäßsystem während der humanen Gravidität ebenfalls erhöht ist (38).

Im Zusammenhang mit fetaler Programmierung sind Einflüsse der maternalen Nutrition auf das pränatale RAS von besonderem Interesse. Verschiedene Studien untersuchten Zusammenhänge zwischen maternaler Ernährung und der Expression von AT2R im Nierengewebe. Mehrere Autoren beschrieben eine Verminderung der AT2R-Expression in der Nierenrinde von Tieren, deren Muttertiere während der Tragzeit proteinrestriktiv ernährt wurden (83–86). *Gilbert et al.* fanden eine gesteigerte AT2R-Expression im Nierenmark der Nachkommen von Muttertieren, die während der Tragzeit einer Malnutrition ausgesetzt wurden (87). *Vehaskarai et al.* fanden in einem ähnlichen Versuch neben einer verringerten renalen AT2R-Expression bei den Nachkommen proteinrestriktiv ernährter Muttertiere eine gesteigerte Expression von AT2R-mRNA im Vergleich mit Kontrolltieren (88). Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass die Entwicklung des intrarenalen RAS während der perinatalen sowie während der frühen postpartalen Phase durch den Ernährungsstatus der Muttertiere beeinflusst wird (88).

*Lamparter et al.* untersuchten im Tierversuch den Einfluss der AT2R-Funktion auf das Geburtsgewicht, indem sie trächtigen Muttertieren den AT2R-Antagonisten PD123319 verabreichten. Das Geburtsgewicht der Nachkommen unterschied sich nicht signifikant von dem der Kontrolltiere (89). Ein Einfluss des AT2R auf das Geburtsgewicht konnte hier nicht nachgewiesen werden.

### 1.2.3 Präeklampsie

Da eine Beteiligung des RAS an den pathophysiologischen Abläufen, welche zu einer Präeklampsie führen als sehr wahrscheinlich gilt und da einige Parameter untersucht wurden, welche in dem Zusammenhang diagnostische und prognostische Relevanz besitzen, soll im Verlauf dieser Arbeit näher auf diese Erkrankung eingegangen werden.

Bei der Präeklampsie handelt es sich um eine Erkrankung, die während der Schwangerschaft auftritt. Sie manifestiert sich in der Regel ab der 20. Schwangerschaftswoche und es zeigen sich Symptome wie Hypertonie, Erhöhung der peripheren vaskulären Widerstände und Proteinurie. Schwere Verlaufsformen sind bekannt, bei denen sich die Symptomatik bis hin zu pulmonalen Ödemen, fetalen Wachstumsstörungen, Thrombozytopenie und Leberfunktionsstörungen führen kann. Die Inzidenz der Präeklampsie unter allen Schwangerschaften beträgt 6-8%, bei Frühgeburten liegt sie bei 20%. Sie wird häufiger bei primigravida als bei mehrgebärenden Frauen sowie bei erhöhtem maternalem Alter beobachtet, In 10-20% der Fälle kommt es zu einer Leberbeteiligung mit Transaminasenerhöhung. Bei 0,1-0,2% der Schwangerschaften treten Krampfanfälle auf und man spricht von einer Eklampsie. Die Mortalität beträgt 100.000 Frauen pro Jahr weltweit. Der Anteil an der gesamten Müttersterblichkeit beträgt 10-20% (90–92).

Der genaue Pathomechanismus der Präeklampsie ist unklar. Die Symptomatik ist regredient bei Entfernung der Plazenta, d.h. im Regelfall postpartal. Bei embryonalen Fehlentwicklungen, wie z.B. im Rahmen einer Blasenmole persistiert die Symptomatik, weshalb davon ausgegangen wird, dass nicht der Fetus, sondern die Plazenta, die als hormonbildendes Organ den Austausch von Stoffen zwischen dem Fetus und der Mutter steuert eine ursächliche Rolle bei der Entstehung der Erkrankung spielt. Als Auslöser wird eine gestörte Plazentation angenommen. Bei der physiologischen Plazentation kommt es zu einem Eindringen von extravillösen Trophoblastzellen, die dem Fetus entstammen, in die uterinen Spiralarterien der Dezidua und des Myometriums. Dies führt zu einem Remodeling der Spiralarterien mit dem Ersetzen des Gefäßendothels durch die Trophoblastzellen, dem Verlust der Kontraktilität und einer Vasodilatation mit dem Ziel einer adäquaten Nährstoffversorgung des Fetus. Bei der Präeklampsie konnte eine verminderte Eindringtiefe der Trophoblastzellen in das Myometrium beobachtet werden. Die darunter verminderte Weitstellung der Spiralarterien mündet in einer plazentaren Minderperfusion. Zur Kompensation sezerniert die hypoxische und dysfunktionale Plazenta vasoaktive Substanzen in das maternale Gefäßsystem was zu einer generalisierten endothelialen Dysfunktion und am Ende zur systemischen Manifestation einer Präeklampsie beiträgt (93).

Es gibt inzwischen deutliche Hinweise auf eine Assoziation der Präeklampsie mit Komponenten des

RAS: Während der physiologischen Gravidität lässt sich mit Ausnahme der ACE-Konzentration ein Anstieg aller Komponenten des RAS in der maternalen Zirkulation beobachten (94). Merrill et al. (s Irani paper) konnten in einer Studie zeigen, dass im Gegensatz dazu bei Vorliegen einer Präeklampsie die Expression von Renin, Angiotensin I und Aldosteron im maternalen Kreislauf geringer ist als bei Gesunden (95).

Während bei gesunden Schwangeren die Sensitivität für vasoaktive Substanzen des RAS abnimmt, wurde bei Präeklampsie eine Verstärkung der Sensitivität für RAS-Substanzen im maternalen Gefäßsystem beobachtet. Als Ursache hierfür wurden beobachtete Unterschiede in der molekularen Struktur des AT1R während der Präeklampsie beschrieben (94). Darüber hinaus wurde eine Interaktion der AT1R mit Autoantikörpern beobachtet, welche eine gesteigerte Stimulation des AT1R zur Folge haben (96).



### 1.3 Fragestellung

Es ist bekannt, dass das plazentare RAS das intrauterine Milieu entscheidend mitbestimmt, weswegen diesem Hormonsystem Bedeutung bei der fetalen Entwicklung zukommt (50). Der AT2R, eine der Komponenten des RAS, besitzt Eigenschaften, welche mit der Steuerung von Gewebewachstum und Zellproliferation in Zusammenhang stehen (79,80). Tierexperimentell erhobene Daten legen die Vermutung nahe, dass der AT2R eine Rolle bei der Regulation von Blutdruck und uteroplazentarem Blutfluss spielt (97).

In dieser Arbeit wurde die Rolle des plazentaren AT2R, in einer großen (n = 281) Mutter-Kind-Kohorte näher charakterisiert.

In einem ersten Schritt wurde die relative Proteinkonzentration des AT2R mittels Westernblot in der humanen Plazenta bestimmt. Um den Einfluss der plazentaren AT2R-Expression auf die fetale und kindliche Entwicklung zu untersuchen, wurde anschließend nach Assoziationen zwischen den plazentaren Expressionsdaten und Parametern der fetalen Programmierung gesucht.

Neben einem potentiellen Einfluss auf den Fötus sollten auch mögliche Zusammenhänge zwischen plazentarer AT2R-Expression und maternalem Outcome aufgedeckt werden. Der Fokus der zu untersuchenden mütterlichen Parameter lag auf Blutdruck und Proteinurie. Diese Parameter geben einerseits Auskunft über physiologische Vorgänge während der Schwangerschaft und sind andererseits als Symptome einer möglichen Präeklampsie aussagekräftig (91,92). Dies ist insofern von Bedeutung, als von einer Beteiligung des RAS an dieser Erkrankung ausgegangen wird (91). Ein Einfluss des AT2R auf den Gefäßtonus und die Durchblutung im uteroplazentaren Gebiet gilt als sehr wahrscheinlich (97), es ist jedoch nicht bekannt, welche Rolle der AT2R in der Pathogenese der Präeklampsie tatsächlich spielt. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit nach einer Assoziation zwischen der plazentaren AT2R Expression und den Symptomen einer Präeklampsie gesucht.

Für ein umfassenderes Verständnis der Rolle des AT2R im RAS der Plazenta wurde außerdem der Zusammenhang zwischen AT2R-Expression und der Expression von AT1R untersucht.

Zusammengefasst wurde in dieser Arbeit auf die folgenden Fragestellungen eingegangen:

- Gibt es einen Zusammenhang zwischen der AT2R-Expression in der Plazenta und verschiedenen, nach der Geburt erhobenen kindlichen Parametern, wie dem Geburtsgewicht als Surrogatparameter der FP?
- Gibt es einen Zusammenhang zwischen der AT2R-Expression in der Plazenta und bestimmten präpartalen Ereignissen, wie einer intrauterinen Hypoxie?
- Gibt es einen Zusammenhang zwischen der AT2R-Expression in der Plazenta und bestimmten maternalen Parametern, wie z.B. dem Vorliegen einer Proteinurie, dem Blutdruck und dem Vorliegen einer Präeklampsie?
- Gibt es einen Zusammenhang zwischen der AT2R-Expression in der Plazenta und der Expression von AT1R als weiterer RAS-Komponente?

## 2 Methoden

### 2.1 Kohortenbildung und Datenerfassung

Alle Frauen, welche im Zeitraum von Januar 2000 bis 2004 in der Klinik für Gynäkologie im Campus Mitte der Charité, Universitätsklinikum Berlin, entbunden hatten, wurden im Anschluss an die Entbindung um die Teilnahme einer retrospektiven Kohortenstudie angesucht. Diese Studie war zuvor von der lokalen Ethikkommission bewilligt worden. Eine geringe Anzahl an Frauen (6,3%) lehnte die Teilnahme an dieser Studie ab.

Für die hier vorliegende Untersuchung wurde eine Untergruppe von den Patientinnen gebildet, welche zwischen November 2002 und Januar 2004 entbunden hatten. Zu Beginn wurde eine Einwilligung der Mütter eingeholt und Blut- und Plazentaprobe durch die Mitarbeiter des Kreißsaals und der Wöchnerinnenstation gewonnen und aufbewahrt. Die Proben wurden gekühlt, transportiert und für die weitere Verarbeitung präpariert bzw. sofort eingefroren. Mit den Müttern wurde ein strukturiertes Interview durchgeführt, bei welchem folgende Daten erhoben wurden: Gewicht vor der Schwangerschaft, Größe, Nationalität, Nikotinkonsum vor und während der Schwangerschaft, Familienanamnese. Es wurde besonderes Augenmerk auf das Auftreten von Hypertonie und metabolischen Erkrankungen gelegt und die Probanden wurden gefragt, ob bei vorherigen Schwangerschaften ein Schwangerschaftshypertonus aufgetreten sei, ob eine hypertensive Erkrankung vorläge und ob diese medikamentös behandelt würde. Ebenso wurde nach Vorliegen und Therapie eines Diabetes und Fettstoffwechselstörungen gefragt. Zur genaueren Differenzierung wurde nach präexistentem Diabetes und Gestationsdiabetes unterschieden. Ergänzt wurde diese Befragung durch Daten aus dem Mutterpass und der Krankenakte. Dies umfasste: Alter der Mutter, Größe, Gewicht während der Schwangerschaft, Anzahl der Schwangerschaften und Geburten, der Geburtstermin (errechnet und korrigiert), Vorliegen von Ödemen und Blutdruckwerte bei den Vorsorgeuntersuchungen, Schwangerschaftskomplikationen, Geburtsmodus und -lage und Laborparameter. Die postpartal erhobenen Untersuchungsdaten der Neugeborenen wurden den Krankenakten entnommen und in die Datenbank eingearbeitet. Hierzu gehörten u. a. Länge, Geburtsgewicht, Kopfumfang, Geschlecht, Gestationsalter und APGAR-Score.

Da der Body-Mass-Index (BMI) aufgrund der relativ größeren Körperoberfläche bei Neugeborenen und Kleinkindern hinsichtlich der Beurteilung der Masse nur ungenaue Aussagen liefert, wurde hier der Ponderalindex (PDI) herangezogen (98). Zu seiner Berechnung wird, im Gegensatz zum BMI,

die Körpermasse durch die dritte Potenz der Körpergröße geteilt ( $\text{g}/\text{cm}^3$ ).

Als untergewichtig gelten Neugeborene mit einem Geburtsgewicht von unter 2500g. Frühgeburtlichkeit lag vor, wenn die Geburt vor der vollendeten 37. Schwangerschaftswoche stattfand.

Um den klinischen Zustand des Neugeborenen in die Analyse mit aufzunehmen wurde die Beziehung des AT2R zum APGAR-Score untersucht. Der APGAR-Score ist ein schnell durchzuführender Test, der Hinweise auf die Gesundheit sowie auf das Mortalitätsrisiko des Neugeborenen liefert. Mit ihm werden die Eigenschaften Hautfarbe, Herzfrequenz, die Reflexauslösbarkeit, der Muskeltonus sowie die Effizienz der Atmung mit einer Skala von 0 bis 2 bewertet. Durch Addition der Punkte der einzelnen Eigenschaften erhält man einen Zahlenwert zwischen 0 und 10. Werte von 7 und darüber gelten als unauffällig, Werte von 4 bis 6 als leicht erniedrigt, Werte von 3 und darunter gelten als kritisch erniedrigt und weisen auf die Notwendigkeit von unterstützenden Maßnahmen hin. Die Durchführung des Tests zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Geburt liefert Hinweise auf die Schwere der Störung sowie auf die Dauer der Notwendigkeit unterstützender Maßnahmen (99).

Für diese Arbeit wurden aus humanen Plazentaprobe die AT2R-Expression von 284 Proben bestimmt. 2 Proben wurden ausgeschlossen, da ihre Untersuchung trotz mehrmaliger Wiederholung keine Resultate lieferte. Insgesamt verblieben 282 Proben, die in die folgende statistische Analyse einbezogen wurden.

## 2.2 Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
25x complete protease inhibitor	Roche diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Ammoniumpersulfat	Fluka, Hamburg, Deutschland
BSA bovine serum albumin	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Dimethylsulfoxid	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Milchpulver	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
NaCl (Natriumchlorid)	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumazid	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
p-Comarinsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
PAA Polyacryl Säure	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Rockford, USA
Ponceau-S	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Rotiload 1	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
SDA (natriumacetat)	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
SDS (Natriumaurylsulfat)	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
TEMED (Tetramethylendiamin)	Bio Rad, München, Deutschland
Tetramethylethyldiamin	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Wasserstoffperoxid	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 2: Übersicht über die zur Proteinbestimmung verwendeten Chemikalien

## 2.3 Verwendete Lösungen

- Lysepuffer mit Proteinaseinhibitor (1M Tris, 1,5M NaCl, SDA, SDS 10% (w/v), Triton X-100, 25x complete protease inhibitor, Natriumazid 0,3% (w/v), pH 8,5)

5ml enthalten: 0,25ml 1M Tris Puffer, ein pH von 8,5 wurde eingestellt, 0,5ml 1,5M NaCl, 0,025g SDA, 0,05ml SDS 10% (w/v), 0,05ml Triton X-100, 0,2ml 25x complete protease inhibitor, 0,5ml 0,3% (w/v) Natriumazid, 3,45ml MQ-H<sub>2</sub>O (durch Milli-Q Purification System aufbereitetes Wasser)

- Trenngelpuffer (1,5M Tris, pH 8,8)

36,6g Tris in 200ml MQ-H<sub>2</sub>O gelöst, ein pH von 8,8 wurde eingestellt und im Anschluss autoklaviert; eine gekühlte Lagerung war erforderlich

- Sammelgelpuffer (1,0M Tris, pH 6,8)

12,12g Tris in 100ml MQ-H<sub>2</sub>O gelöst, ein pH von 6,8 wurde eingestellt und im Anschluss autoklaviert, eine gekühlte Lagerung war erforderlich

- PAA Trenngel (PAA Polyacryl Säure 30%, 1,5M Tris pH 8,8, SDS 10% (w/v), Ammoniumpersulfat 10% (w/v), TEMED (Tetramethylethyldiamin))

25ml eines PAA Trenngels 10% (v/v) enthalten: 8,3ml PAA Polyacryl Säure 30%, 6,3ml 1,5M Tris, ein pH von 8,8 wurde eingestellt, 0,25ml SDS 10% (w/v), 0,25ml Ammoniumpersulfat 10% (w/v), 0,01ml TEMED, 9,9ml MQ-H<sub>2</sub>O

- PAA Sammelgel (PAA-Polyacrylsäure 30%, 1,0M Tris pH 6,8, SDS 10% (w/v), Ammoniumpersulfat 10% (w/v), TEMED)

15ml eines PAA Sammelgels 5% (v/v) enthalten: 2,53ml PAA-Polyacrylsäure 30%, 1,88ml 1,0M Tris, ein pH von 6,8 wurde eingestellt, 0,15ml SDS 10% (w/v), 0,15ml Ammoniumpersulfat 10% (w/v), 0,015ml TEMED, 10,2ml MQ-H<sub>2</sub>O

- Tris buffered Saline-Tween (20mM Tris, 140mM NaCl, 0,1% v/v Tween 20, pH 7,6)

1L 10fach TBS: 24,2g Tris, 80g NaCl, pH 7,6 eingestellt, auf 1 Liter aufgefüllt und gemischt; 10L TBS-T: 1L 10fach TBS, 9L destilliertes Wasser, 10ml Tween 20

- Elektrophoresepuffer (25mM Tris, 250mM Glycin, 0,1% SDS)

1L 5fach Elektrophoresepuffer: 15,25mg Tris, 94g Glycin, 50ml SDS 10%, auf 1 Liter aufgefüllt

- Transferpuffer: (25mM Glycin, 24mM Tris, 20% v/v Methanol)

1L 5fach Transferpuffer: 69,2g Glycin, 14,5g Tris auf 1 Liter aufgefüllt, vor dem Transfer im Verhältnis 3:1:1 mit H<sub>2</sub>O und Methanol gemischt

- Strippingpuffer (25mM Glycin, 1% (w/v) SDS, pH 2)

0,5L Strippingpuffer: 0,935g Glycin, 50ml SDS 10% (w/v), pH 2 eingestellt und auf 0,5Liter aufgefüllt

- Ponceau Lösung (0,1% (w/v) Ponceau-S, 2ml 100% (v/v) Essigsäure)

40ml Ponceau Lösung: 0,04g Ponceau-S, 2ml 100% (v/v) Essigsäure, 38ml H<sub>2</sub>O

- Enhanced Chemiluminescence (ECL) Solution 1

100ml ECL Solution 1: 1ml Luminol (0,8858g in 20ml Dimethylsulfoxid in 1ml Aliquots, bei -20°C gelagert, vor Licht geschützt beim Auftauen und Weiterverarbeiten), 440µl p-Comarinsäure (0,2956g in 20ml Dimethylsulfoxid, in 0,5ml Aliquots, bei -20°C gelagert), 88,5ml H<sub>2</sub>O, in einem lichtundurchlässigen Gefäß aufbewahrt

- Enhanced Chemiluminescence (ECL) Solution 2

100ml ECL Solution 2: 64µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 10ml 1M Tris pH 8,5 (Lösung autoklavieren), 90ml H<sub>2</sub>O, in einem lichtundurchlässigen Gefäß aufbewahrt

Die hier aufgeführten Lösungen wurden selbst hergestellt.



## 2.4 Verwendete Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Biometra standard power pack P25	Biometra, Göttingen, Deutschland
Elektrophoresekammer TV200	Biotop, Jahnsdorf, Deutschland
Entwicklermaschine Curix 60	Agfa, Mortsel, Belgien
Feinwaage BL 1500S	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Film Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Inkubator Thermomix 5436	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Milli Q Wasseraufbereiter	Milli-Q Purification System, Billerica, MA, USA
Nitrozellulosemembran	Whatman, Dassel, Deutschland
PH-Meter WTW pH537	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim, Deutschland
Präzisionswaage Scaltec SBC22	Scaltec Instruments, Göttingen, Deutschland
Schüttler WT-17	Biometra, Göttingen, Deutschland
Safelock-Tubes	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Semidry Blotter	SD Transblot Biorad, München, Deutschland
Spectrophotometer Du 530 UV/Vis	Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland
Ultraschallstab Sonoplus	Bandelin, Berlin, Deutschland
Vortex Genie 2 Mixer	Bernder & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Whatman Filterpapier	Whatman, Dassel, Deutschland
Whatman Zellulosemembran	Whatman, Dassel, Deutschland

Tabelle 3: zur Proteinbestimmung verwendete Geräte

## 2.5 Proteinextraktion

Von den tiefgefrorenen Plazenten wurden zunächst mithilfe eines Skalpells in Form und Größe möglichst homogene Stücke entnommen. Es wurde darauf geachtet, dass makroskopisch möglichst gewebereiche und blutarme Stücke gewonnen wurden. Diese wurden anschließend in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und mit Hilfe eines Metalmörser, welcher ebenfalls zuvor im Stickstoffbad tiefgekühlt wurde, und einem Hammer zu einem feinen Pulver verarbeitet. Für jede Probe wurde ein 1,5ml Safelock-Tube leer gewogen, mit dem erzeugten Pulver gefüllt und wiederholt gewogen, um so das Gewicht der abgefüllten Probe zu ermitteln. Pro 100mg Probe wurde 1ml Lysepuffer mit Proteinaseinhibitor hinzugefügt. Dieser wurde erst kurz vor Zugabe angemischt. Nach Durchmischung mittels Vortex wurden die Proben durch Ultraschallbehandlung in 5 Durchgängen für je 3 mal 10 Sekunden weiter zerkleinert. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur folgte eine 12-minütige Zentrifugation bei 12000upm. In dem hierbei entstandenen Überstand wurde mit BCA Assay photometrisch die Proteinkonzentration gemessen. Anhand dieser Proteinkonzentrationen wurden Aliquots mit 5µg/ml Protein hergestellt, welche anschließend bei -20°C eingefroren wurden.

Als Standard sollte eine Mischung aller Proben dienen. Diese wurde ebenfalls auf 5µg Protein pro ml verdünnt und bei -20°C eingefroren.

## 2.6 Western Blot

### 2.6.1 Elektrophorese

Vor dem eigentlichen Blotten mussten die einzelnen Proteinfractionen aufgetrennt werden. Hierzu wurde eine Elektrophorese durchgeführt, bei der die Auftrennung nach den jeweiligen Molekulargewichten geschieht. Vor jeder Verwendung der Elektrophoreseeinrichtung wurden die Glasplatten, die Spacer, die Kämme und die Gießhalterung der Elektrophoresekammer mit Ethanol gereinigt. 25ml des PAA Trenngels 10% (v/v) wurden angemischt und in die Elektrophoresekammer eingefüllt. Damit sich eine glatte Gelkante bildet, wurde das Gel mit 0,5ml Isopropanol überschichtet. Es folgte eine einstündige Polymerisation bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurde das Isopropanol abgegossen und die Kämme eingesetzt. 15ml des PAA-Sammelgels 5% (v/v) wurden angemischt und damit die Kammer aufgefüllt. Das Gel wurde anschließend für 30 Minuten bei Raumtemperatur zum Auspolymerisieren stehengelassen.

In die Elektrophoresekammer wurde die Gelhalterung eingesetzt. Anschließend wurden 0,7 Liter des Elektrophoresepuffers in den äußeren Behälter der Elektrophoresekammer eingefüllt. Es wurde überprüft, ob sich an der unteren Gelkante Luftblasen angesammelt hatten, welche nun vorsichtig mit einer Spritze und einer dünnen Kanüle entfernt werden mussten. Der übrige Elektrophoresepuffer wurde in die innere Kammer eingefüllt. Die Aliquots mit dem 5µg/ml Proteinansatz wurden schonend auf Eis aufgetaut. Von jeder der zu untersuchenden Proben wurden 15µl entnommen und mit 7,5µl MQ-H<sub>2</sub>O und 7,5µl reduziertem Ladepuffer (Rotiload 1) versetzt. Aus der Standardprobe wurde eine Probenreihe mit ansteigender Proteinkonzentration (20, 25, 30, 35 und 40µg/ml) erstellt. Auch diese Reihe wurde mit Ladepuffer versetzt. Die Proben selbst mussten nun für 5 Minuten bei 95°C inkubieren. Anschließend wurden sie auf Eis gelegt und, nachdem sie abgekühlt waren, kurz zentrifugiert.

Geltasche Nummer	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	...	44
	Standardgemisch für Eichgerade					Marker		Proben			Marker						
Konzentration/ Probennummer	20	25	30	35	40			2686	2687	...							
Probe [µl]	20	25	30	35	40			15	15	15							
H <sub>2</sub> O [µl]	25	20	15	10	5			7,5	7,5	7,5							
Ladepuffer [µl]	15	15	15	15	15			7,5	7,5	7,5							
Gesamtmenge [µl]	60	60	60	60	60			30	30	30							

Abbildung 4: Schema der Beladung der Gele

Die Geltaschen wurden durch einen Kamm mit 48 Zinken vorgeformt. Die so entstandenen 48 Taschen konnten eine Standardreihe und 15 Proben jeweils zur Doppelbestimmung aufnehmen. Ein Molekulargewichtsmarker (Fermentas, PageRuler Prestained Protein Ladder) am Anfang und Ende der Probenreihe dienten in jedem Gel zur besseren Orientierung.

Die Elektrophorese lief in einer Kühlkammer bei 4°C ab. Für die ersten 30 Minuten wurde eine Spannung von 80 Volt angelegt, für weitere 2 Stunden und 30 Minuten lag eine Spannung von 110 Volt an.

### **2.6.2 Blotten**

Die getrennten Proteinfractionen der Probenlösungen wurden auf eine Trägermembran übertragen. Hierzu standen für jedes Gel vier Lagen zurechtgeschnittenes Whatman-Filterpapier in den Maßen 5,5 x 18cm und eine Nitrozellulosemembran bereit. Vor Gebrauch mussten die Nitrozellulosemembranen für zwei Minuten in destilliertem H<sub>2</sub>O aktiviert werden. Nach der Elektrophorese wurden die Gele aus der Elektrophoresekammer genommen und zusammen mit dem Whatman Papier und der Nitrozellulosemembran für zehn Minuten in den Transferpuffer gelegt. Anschließend wurden die Gele mit dem Whatman Papier und der Nitrozellulosemembran nach Art eines „Sandwich“ übereinandergestapelt in den Semidry Blotter gelegt. Hierzu wurden zwei Lagen Whatman-Papier, die Nitrozellulosemembran, das Gel und zwei weitere Lagen Whatman Papier übereinandergelegt. Das Auflegen des Gels auf die Nitrozellulosemembran musste hierbei möglichst zügig erfolgen, um den Einschluss von Luftblasen zu verhindern. Dadurch wurde eine ungestörte Übertragung der Proteinfractionen auf die Nitrozellulosemembran ermöglicht. Zum Blotten selbst wurde für eine Stunde eine Spannung von 25 Volt angelegt. Die Anode lag hierbei in Richtung der Nitrozellulosemembran, so dass die Proteine hier einwandern konnten.

### 2.6.3 Nachweis der Proteine

Anschließend wurde überprüft, ob der Blottvorgang erfolgreich war. Hierzu wurde die Nitrozellulosemembran für drei Minuten in 20ml Ponceau-S geschwenkt und anschließend dreimal mit destilliertem H<sub>2</sub>O gewaschen. Hierdurch wurden Banden sichtbar, welche den einzelnen, nach Molekulargewicht aufgetrennten, Proteinen entsprachen. Der Nitrozellulosestreifen enthielt die Banden für den AT2R bei 50kDa und Banden für Aktin bei einem Molekulargewicht von 40kDa.

Im nächsten Schritt wurden die Farbmarkierungen abgewaschen. Hierzu wurden die Membranen dreimal für 5 Minuten in TBS-T geschwenkt. Um ein Binden der Antikörper zu verhindern, erfolgte als nächstes ein Blocken der unspezifischen Proteinbindungsstellen. Hierzu wurden die Streifen für 1 Stunde in TBS-T-Milch 5% (w/v) gelegt.

Nun wurde die AT2R-Expression bestimmt. Über Nacht erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper für AT2R (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, Kalifornien, USA, rabbit 1:5000) 1:10.000 in TBS-T-Milch 5% (w/v), bei einer Temperatur von 4°C. Die Antikörperlösung enthielt Natriumazid, damit sie mehrfach verwendet werden konnte.

Am folgenden Tag wurden die Nitrozellulosemembranen in TBS-T gewaschen. Um die TBS-T-Milch mit dem primären Antikörper möglichst gründlich zu entfernen, wurde in mehreren Schritten gewaschen. Zuerst zweimal kurz und anschließend dreimal für zehn Minuten. In einem weiteren Schritt wurden die Streifen nun im sekundären Antikörper (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, Kalifornien, USA, goat anti rabbit 1:10000) in TBS-T-BSA (bovine serum albumin) 4% (w/v) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach kam ein weiterer Waschgang in TBS-T. Auch hier wurde nach obigem Schema zweimal kurz und dreimal für zehn Minuten gewaschen.

Im nächsten Schritt wurden die gebundenen Antikörper durch die ECL-Solution sichtbar gemacht und auf Fotopapier festgehalten. Dazu mussten die vorbereiteten Lösungen ECL Solution 1 und ECL-Solution 2 im Verhältnis 1:1 gemischt werden. In dieser Mischung fand eine 3-minütige Inkubation der Membranen statt. Anschließend wurden sie auf einen Film in eine Kodak(R) Filmkassette eingelegt und jeweils für 30 Sekunden, 2 Minuten und 5 Minuten belichtet. Somit standen zur späteren Analyse mehrere Belichtungen zur Verfügung, aus denen die optimale ausgewählt werden konnte. Zur Entwicklung der Filme stand eine vollautomatische Entwicklungsmaschine bereit. Nach der Entwicklung wurden die Membranen zweimal kurz und dreimal zehn Minuten in TBS-T gewaschen.

Der nächste Schritt bestand darin, die Banden der Aktinkonzentrationen darzustellen. Die Membranen wurden erst für 30 Minuten in einem 50°C warmen, mit Stripping-Puffer versetzten,

Wasserbad gewaschen. Dadurch wurden die bereits im vorherigen Schritt gebundenen Antikörper wieder entfernt. Es folgten zwei kurze und drei zehnmütige Bäder in TBS-T, das Blocken der unspezifischen Proteinbindungsstellen in TBS-T-Milch 5% (w/v) für eine Stunde und ein weiterer Waschgang mit drei fünfminütigen Bädern in TBS-T. Im Anschluss wurden die Membranen für eine Stunde mit dem Primäantikörper für Aktin (Sigma, München, Deutschland, anti Aktin A5060 polyclonal anti rabbit, 1:100.000) in TBS-T-Milch 5% (w/v) inkubiert. Hierauf folgte ein Waschgang bestehend aus zwei kurzen Spülungen und drei zehnmütigen Bädern in TBS-T und die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, Kalifornien, USA, goat anti rabbit 1:10000 in TBS-T 4% (w/v) -BSA) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Es schloss sich ein weiterer Waschgang in TBS-T an. Wie oben beschrieben, wurden die Membranen wieder für drei Minuten in ECL-Solution inkubiert, das Fotopapier belichtet und die Fotos entwickelt.



Abbildung 5: AT2R-Banden bei 50kDA

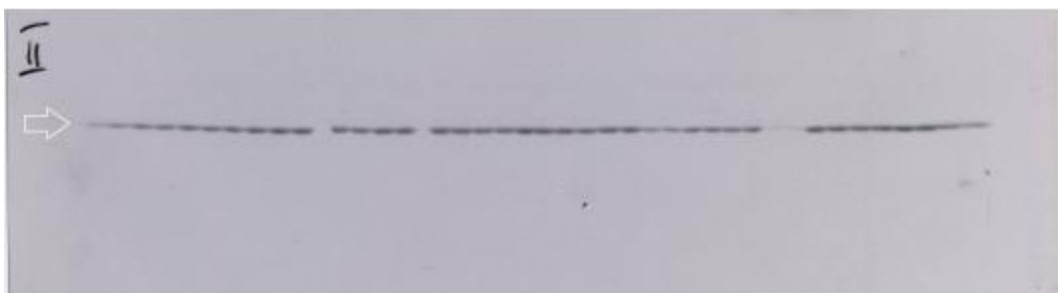


Abbildung 6: Aktin-Banden bei 40kDA

## 2.6.4 Bestimmung der Proteinexpression

Die fertigen Fotos wurden gescannt und als Bilddatei auf einem PC abgespeichert. Es wurde ein Canon (Tokyo, Japan) CanoScan 4400F Scanner bei einer Auflösung von 600 dpi genutzt. Aus den Bildern konnte nun rechnergestützt zunächst die Signalintensität ermittelt werden. Hierzu wurde das Programm AlphaEase™ in der Version 3.2.1 genutzt. Um die Signalintensität zu ermitteln, mussten die einzelnen Banden genau mit dem Cursor umfahren und markiert werden. Da es sich bei den Fotos um Negative handelte, bedeutete eine dunklere Färbung eine stärkere Signalintensität. Die Stärke der Färbung (integrated density value = IDV), die Fläche der Umfahrung (Area) und ein Wert für die Stärke der Färbung des Hintergrunds (Background) (für einen Bereich, den man vorher als Hintergrund festgelegt hatte) wurden durch AlphaEase™ ausgegeben.

Die so ermittelten Werte wurden in mit Open Office™ erstellte Tabellen eingetragen. Von den ermittelten IDV-Werten subtrahierten wir das Produkt von Fläche und dem Mittelwert von drei Hintergrundintensitätswerten. Diese Berechnung wurde für alle AT2R- und für die Aktinbanden wiederholt.

Der ermittelte neue Intensitätswert (INT) wurde in die Tabelle eingetragen. Auch für die Banden der Standardreihe wurden INT-Werte errechnet. Wie oben beschrieben bestand die Standardreihe aus Proben mit steigender Proteinkonzentration (20, 25, 30, 35 und 40 µg/ml). Aus diesen Werten ließ sich eine Eichgerade erstellen, welche die steigende Intensität der Banden bei steigender Konzentration darstellte und sich in einer Formel nach dem Muster  $y = mx + n$  ( $m$  = Anstieg der Geradengleichung,  $n$  = Schnittpunkt mit der y-Achse) ausdrücken ließ. Durch Umstellung der Gleichung nach „ $x$ “ und Eingabe des jeweiligen INT-Wertes als „ $y$ “, ließ sich für jeden ermittelten INT-Wert ein Wert für Konzentration (KONZ) errechnen. Auf diese Weise konnte jeder absolute Wert einer Einzelprobe mit der Standardreihe abgeglichen werden. Somit wurde es ermöglicht, unterschiedliche Bedingungen des Verfahrens auszugleichen.

Diese Prozedur wurde für die Aktinbande wiederholt. Auch für INT-Werte des Aktins wurden entsprechende KONZ-Werte errechnet. Der KONZ-Wert der AT2R-Bande wurde durch den KONZ-Wert der Aktinbande dividiert, um eine zu Aktin relative AT2R-Konzentration zu ermitteln. Hierdurch wurde eine zusätzliche Fehlerkorrektur der Gesamtmenge an Protein hinsichtlich einer inkompletten Übertragung der Banden während des Blottens erreicht.

Für jede Probe wurden mindestens zwei, durchschnittlich drei Messungen durchgeführt. Der erhaltene Wert stellte eine, zum Aktingehalt der Probe, relative Proteinkonzentration dar. Der Mittelwert als Vielfaches der Aktinkonzentration der Probe betrug für den AT2R  $1,25 \pm 0,53$  ( $n = 282$ ).

## **2.7 Untersuchung weiterer Proteine**

Aus dem gleichen Probensatz wurden durch andere Doktoranden die Expression weiterer Proteine bestimmt. Hierzu wurden die gleichen Methoden benutzt, welche auch zur AT2R Bestimmung angewandt wurden. Auch diese Proteinexpressionen wurden relativ zu der zuvor ermittelten Aktinkonzentration dargestellt, wodurch eine Vergleichbarkeit der Verschiedenen Proteinexpressionen gegeben war. Zu den Proteinen zählen der AT1R, welcher von Marcel Schwietzer bestimmt wurde. Als Antikörper wurde Santa Cruz (Santa Cruz, Kalifornien, USA;) sc-1173-G (N-10) goat benutzt. Die plazentare AT1R Expression wurde in die statistische Analyse mit einbezogen. Da an dieser Studie eine große Anzahl Doktoranden über mehrere Jahre hinweg beschäftigt waren und auch einzelne Proben hinzugefügt oder ausgeschlossen wurden, kam es zu Schwankungen der Anzahl der untersuchten Proben.



## 2.8 Statistische Analyse

Die statistische Analyse wurde mit dem Programm SPSS Statistics for Windows version 19.0 durchgeführt.

Eingangs wurden die statistischen Kennwerte der einzelnen metrischen Parameter bestimmt, um einen besseren Überblick über das Datenmaterial zu erlangen. Zu diesen Kennwerten zählten Mittelwert, Median, Standardabweichung (SD), Minimum, Maximum und die Fallzahl (n). Im Ergebnisteil sind in den Tabellen der Mittelwert, die Standardabweichung und die Anzahl der Fälle angegeben.

Für die nominal- und ordinalskalierten Variablen wurde die absoluten und relativen Häufigkeiten berechnet. Neben den Häufigkeiten, welche als Prozentzahl angegeben sind, wird die Anzahl der Fälle angegeben.

Zur grafischen Anschauung der Unterschiede zwischen Gruppen wurden Boxplot Diagramme oder Balkendiagramme erstellt.

Die kontinuierlichen Variablen wurden auf Normalverteilung überprüft. Hierfür wurde der Shapiro-Wilk-Test angewandt.

Unterschiede in kontinuierlichen Variablen zwischen zwei Gruppen wurden mittels Student's t-Test getestet, sofern eine Normalverteilung vorlag. Lag keine Normalverteilung vor, wurde der Mann-Whitney-U-Test benutzt. Wurden mehr als zwei Gruppen getestet wurde der Kruskal-Wallis-Test angewandt.

Korrelationen zwischen der AT2R-Expression und anderen kontinuierlichen Variablen wurden mit der Spearman-Korrelation getestet. Zur grafischen Anschauung der Korrelationen wurden Streudiagramme erstellt.

Der Zusammenhang zwischen plazentarem AT2R und dem Geburtsgewicht wurde zusätzlich auf die Schwangerschaftsdauer adjustiert. Hierfür wurde lineare Regression angewandt.

Die Ratio von AT1R und AT2R Expression wurden für jede Probe berechnet und der Mittelwert angegeben. Im Anschluss wurde die Ratio der AT1R und AT2R Werte für Probandinnen, bei denen während der Schwangerschaft ein Hypertonus aufgetreten war, unabhängig, ob er vorbestehend war und von denen ohne Hypertonus während der Schwangerschaft berechnet und die Mittelwerte

verglichen. Um einen Zusammenhang zu ermitteln wurde der Mann-Whitney-U-Test angewendet.

Ein p-Wert von kleiner als 0,05 wurde als signifikant gewertet.

Da nicht für multiples Testen adjustiert wurde, daher haben die Resultate nur explorativen Charakter.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Ergebnisse der Messungen

#### 3.1.1 AT2R Analyse

Die mittlere plazentare AT2R-Expression betrug  $1,25 \pm 0,52$  ( $n=282$ ). Die Expression bezieht sich auf den integrated density value und bezeichnet ein Vielfaches der plazentaren Aktinkonzentration. Es zeigte sich keine Normalverteilung der Werte.

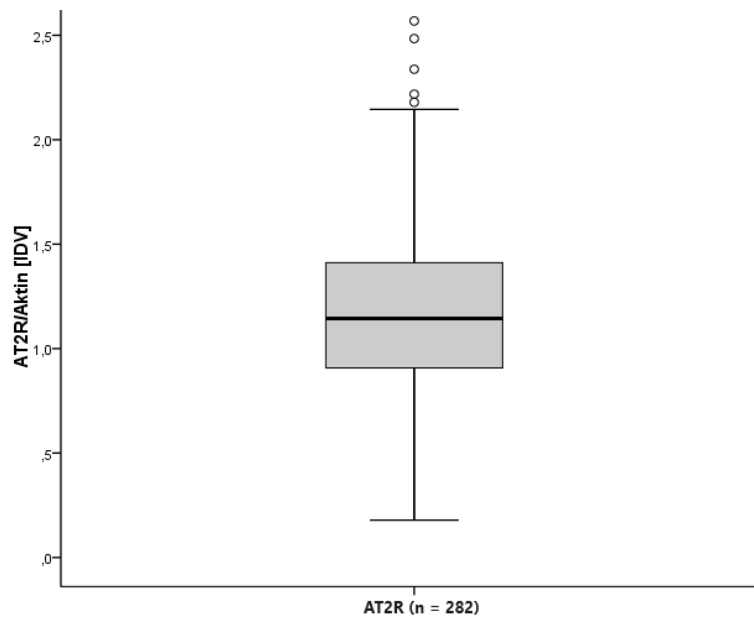


Abbildung 7: Boxplot zu der plazentaren Expression des AT2R in der untersuchten Kohorte angegeben relativ zur Aktinkonzentration

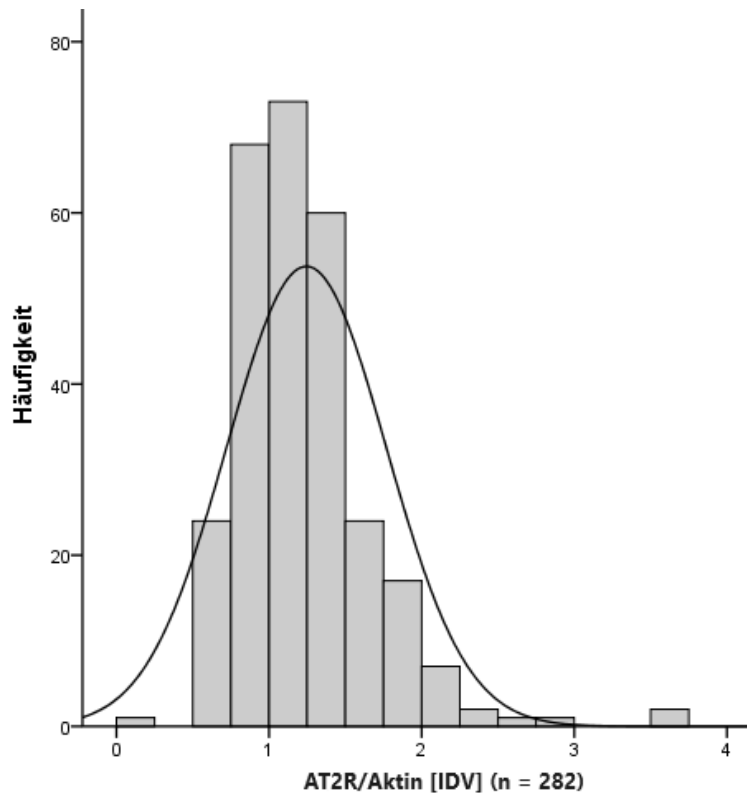


Abbildung 8: Die Verteilung der Häufigkeiten der plazentaren AT2R-Expressionen in der Kohorte relativ zur Aktinkonzentration

Im Vergleich mit dem AT1R zeigte sich eine etwas größere Standardabweichung und ein größerer Variationskoeffizient. Auch die Werte des AT1R sind relativ zur plazentaren Aktinkonzentration angegeben.

Parameter	Wert [IDV]	
AT2R	$1,25 \pm 0,52$	n = 282
AT1R	$1,03 \pm 0,28$	n = 281

Tabelle 4: Vergleich von AT2R und AT1R

### 3.1.2 Charakterisierung der Studienpopulation:

#### 3.1.2.1 *Kinder:*

Die untersuchten kindlichen Parameter sind in Tabelle 5 dargestellt.

<b>Parameter</b>	<b>Werte des Kindes</b>	
Geburtsgewicht [g]	3402,1 ± 635,7	n = 281
erniedrigtes Geburtsgewicht [%]	8,9	n = 281
Graviditätsdauer [Wochen]	38,6 ± 2,15	n = 280
Frühgeburtlichkeit [%]	22,1	n = 280
Plazentagewicht [g]	609,3 ± 161,7	n = 250
Geburtsgröße [cm]	50,9 ± 2,9	n = 281
Kopfumfang [cm]	34,8 ± 1,8	n = 274
Ponderalindex [g / cm <sup>3</sup> ]	25,6 ± 2,8	n = 281
pH im Blut der Nabelarterie [-]	7,30 ± 0,08	n = 280
intrauterine Hypoxie [%]	4,96	n = 121
APGAR Score 5min [-]	9,35 ± 0,87	n = 281
APGAR Score 10min [-]	9,69 ± 0,57	n = 280
Quote Spontangeburt [%]	60,4	n = 280

Tabelle 5: Eigenschaften der Neugeborenen

### 3.1.2.2 Mütter

In der folgenden Tabelle sind die deskriptiven Merkmale der Mütter und des Schwangerschaftsverlaufs dargestellt. Alle diese Werte wurden auf einen Zusammenhang mit dem plazentaren AT2R untersucht. Das durchschnittliche Alter der Gebärenden betrug 31 Jahre. Der durchschnittliche BMI betrug 23,6. In etwa 47% der Fälle handelte es sich um eine Erstgravidität.

Parameter	Werte der Mütter	
Alter [Jahre]	30,7 ± 5,6	n = 281
Größe [cm]	169 ± 6,8	n = 281
BMI am Beginn der Gravidität [kg / m <sup>2</sup> ]	23,6 ± 4,4	n = 276
Gewicht im dritten Trimenon [kg]	78,4 ± 13,2	n = 278
Anzahl der Geburten [n]	1,04 ± 0,2	n = 278
Anzahl der Gravida mit dieser [n]	1,93 ± 1,27	n = 281
Plazentagewicht [g]	609,3 ± 161,7	n = 250
Anzahl Partus mit diesem [n]	1,56 ± 0,81	n = 278
Erstgravidität [%]	46,8	n = 281
Graviditätsdauer [Wochen]	38,6 ± 2,15	n = 280
Rauchen vor / während der Gravidität [%]	27	n = 281
Rauchen während der Gravidität [%]	9,9	n = 281
Rauchen vor der Gravidität [py]	2,31 ± 5,52	n = 279
Zigaretten während der Gravidität [n]	0,6 ± 2,43	n = 273
Hypertonus anamnestisch		n = 280
- nein [%]	88,6	
- nur vor der Gravidität [%]	2,5	
- nur während der Gravidität [%]	3,2	
- vor und während der Gravidität [%]	5,7	
Antihypertensive Therapie vor der Gravidität		n = 281
- keine [%]	97,5	
- 1fache Therapie [%]	1,8	
- 2fache Therapie [%]	0,4	
Antihypertensive Therapie während der Gravidität		n = 281
- keine [%]	98,2	
- 1fache Therapie [%]	0,4	
- 2fache Therapie [%]	0,4	
- 3fache Therapie [%]	0,7	
Proteinurie während der Gravidität [%]	31,1	n = 244
Hypertonus in der Familie [%]	38	n = 279
Diabetes mellitus		n = 280
- vor der Gravidität [%]	0,7	
- während der Gravidität [%]	5,7	

Tabelle 6: Eigenschaften der Mütter

## 3.2 Assoziationen zwischen AT2R und Parametern der Studienpopulation

### 3.2.1 AT2R und Geburtsgewicht

In der gesamten Kohorte zeigte sich keine Korrelation zwischen dem plazentaren AT2R und dem Geburtsgewicht des Kindes ( $p = 0,922$ ).

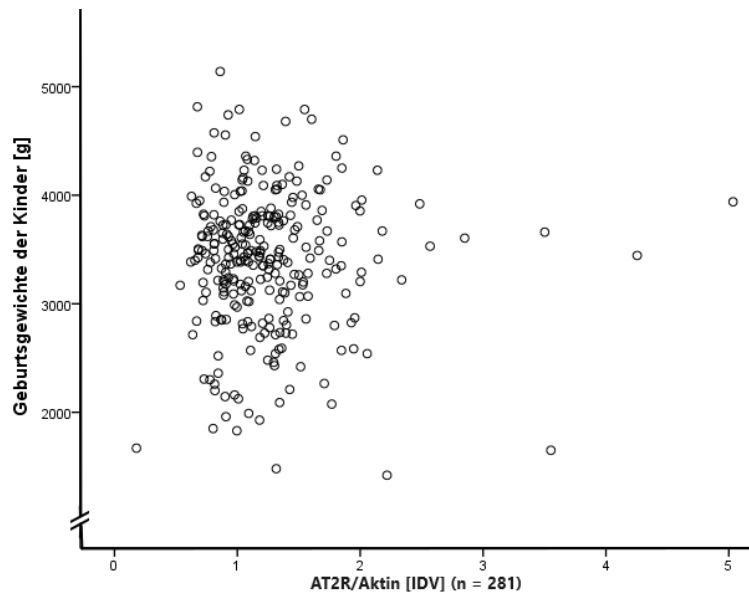


Abbildung 9: Zusammenhang zwischen plazentarem AT2R und dem Geburtsgewicht der Kinder

Da das Geburtsgewicht durch die Länge der Schwangerschaft beeinflusst worden sein könnte, wurde die Analyse auf die Schwangerschaftslänge adjustiert. Auch hier fand sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen AT2R in der Plazenta und dem Geburtsgewicht ( $-0,058$  (Breite 95% Konfidenzintervall  $< 0,1$ ,  $p = 0,432$ )).

Die Berücksichtigung einer Untergewichtigkeit der Neugeborenen bei Geburt ergab keinen signifikanten Zusammenhang zum placentaren AT2R ( $p = 0,551$ ). Der Grenzwert für das Vorliegen eines Untergewichts betrug 2500g.

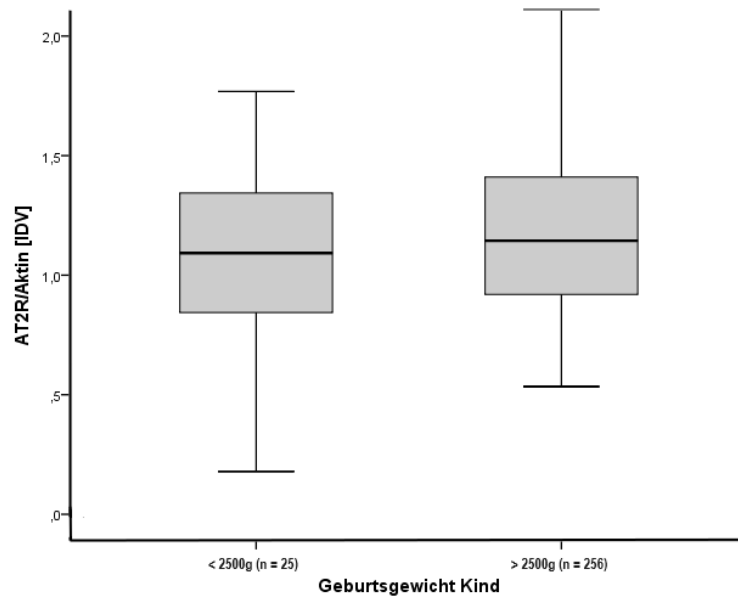


Abbildung 10: Boxplot der placentaren AT2R-Expression bei Neugeborenen mit Untergewicht und mit Normalgewicht



### 3.2.2 AT2R und der Zusammenhang zu weiteren kindlichen Parametern

Des Weiteren wurden die Zusammenhänge zwischen AT2R und der kindlichen Größe, des kindlichen Kopfumfangs, des Plazentagewichts, des Geschlechts und des Ponderalindex untersucht. Sofern es sinnvoll erschien wurden die einzelnen Werte sowohl univariat als auch adjustiert auf die Schwangerschaftslänge berechnet. Wie in der Tabelle 6 dargestellt, zeigten sich keine signifikanten Zusammenhänge.

<b>Parameter</b>	<b>p (univariat)</b>	<b>p (adjustiert auf Graviditätsdauer)</b>
Geburtsgröße	0,99	0,56
Kopfumfang	0,62	0,78
Plazentagewicht	0,85	0,42
Ponderalindex	0,64	0,5
Geschlecht	0,18	

Tabelle 7: Überprüfung auf Zusammenhänge zwischen plazentarem AT2R und erhobenen kindlichen Parametern mit Adjustierung auf die Graviditätsdauer

### 3.2.3 AT2R und Gestationsalter

Es fand sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Gestationsalter und dem plazentaren AT2R ( $p = 0,516$ ).

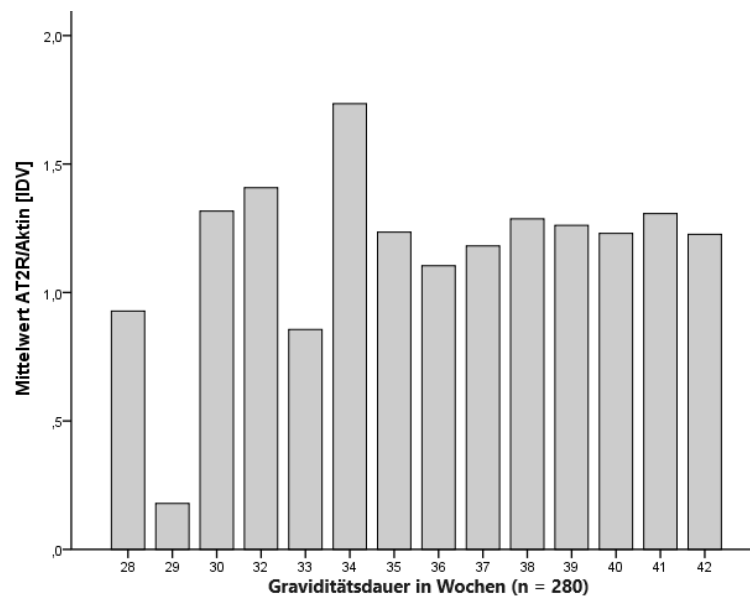


Abbildung 11: Zusammenhang zwischen Gestationsalter in Wochen und dem plazentaren AT2R

Des Weiteren wurden die Neugeborenen, je nachdem ob eine Frühgeburt vorlag in zwei Gruppen eingeteilt. Als Frühgeburt galt eine Geburt vor der vollendeten 37. Schwangerschaftswoche. Zwischen diesen Gruppen fand sich kein signifikanter Zusammenhang hinsichtlich des placentaren AT2R ( $p = 0,185$ ).

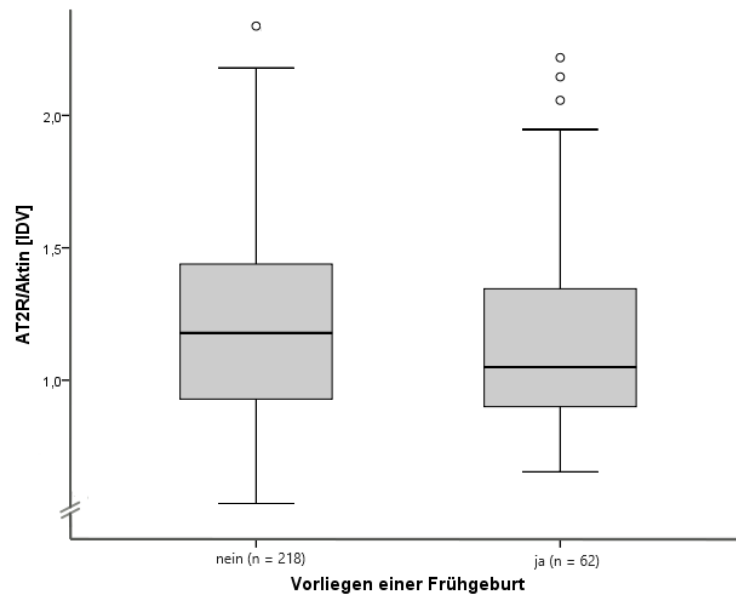


Abbildung 12: Boxplot zum Zusammenhang zwischen dem placentaren AT2R und Frühgeburtslichkeit, rechts sind Fälle dargestellt, bei denen eine Geburt vor der vollendeten 37. Schwangerschaftswoche vorlag, links die Fälle mit Geburten ab der 38. Schwangerschaftswoche

### 3.2.4 AT2R und APGAR-Score

Um den klinischen Zustand des Neugeborenen in die Analyse mit aufzunehmen wurde die Beziehung des AT2R zum APGAR-Score untersucht. Der APGAR Score umfasst die Beurteilung von Herzfrequenz, Atemanstrengung, Reflexauslösbarkeit, Muskeltonus und Hautfarbe. Er wurde jeweils fünf und zehn Minuten postnatal erhoben.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob sich zwischen den APGAR-Werten, welche fünf und zehn Minuten nach der Geburt erhoben wurden und der Expression des plazentaren AT2R ein statistischer Zusammenhang zeigt. Bei der Analyse der Ergebnisse ließ sich mittels Kruskal-Wallis-Test kein signifikanter Zusammenhang darstellen:

APGAR fünf Minuten:  $9,35 \pm 0,87$ ,  $n = 280$ ,  $p = 0,837$

APGAR zehn Minuten:  $9,69 \pm 0,57$ ,  $n = 280$ ,  $p = 0,533$

Auch adjustiert auf die Schwangerschaftslänge zeigte sich kein Zusammenhang zum plazentaren AT2.

Der geringste APGAR fünf Minuten Wert betrug 6. Im Bereich von 5 bis 7 Punkten wird von einer geringen Anpassungsstörung ausgegangen. Hiervon waren 11 von 282 Neugeborenen betroffen. Es wurde überprüft, ob zwischen dem plazentaren AT2R und dem Vorliegen einer geringen Anpassungsstörung ein Zusammenhang besteht. Mittels Mann-Whitney-U-Test wurde kein signifikanter Zusammenhang festgestellt ( $p = 0,282$ ,  $n = 282$ ).

### 3.2.5 AT2R und Hypoxie / pH-Wert im Blut der Nabelarterie

Es wurde untersucht, ob sich bei Neugeborenen, welche im Verlauf der Geburt eine intrauterine Hypoxie erlitten, eine Beziehung zu AT2R in der Plazenta darstellen lässt. Mittels Mann-Whitney-U-Test zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang (ja = 5%, n = 120, p = 0,016). Die betroffenen Neugeborenen wiesen eine signifikant höhere plazentare AT2R-Expression auf.

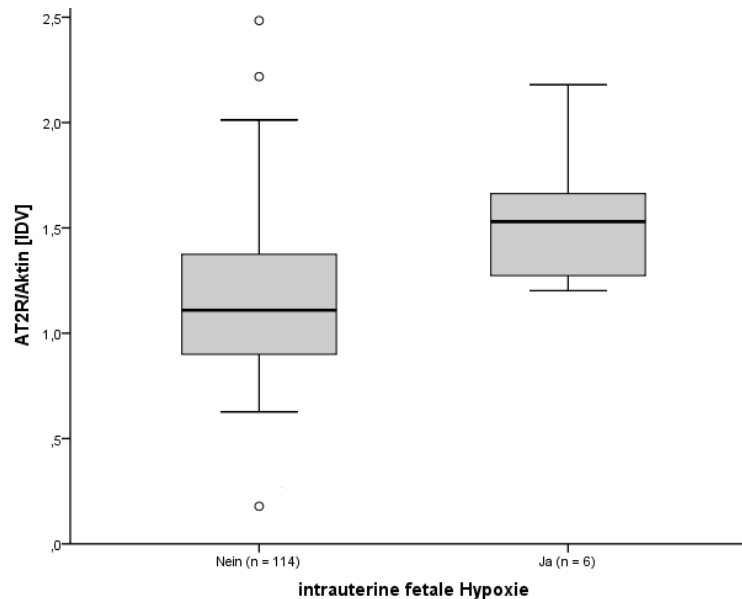


Abbildung 13: Boxplot zum Zusammenhang zwischen postpartal, plazentarem AT2R und dem Vorliegen einer intrauterinen Hypoxie, rechts sind die Fälle dargestellt, bei denen eine intrauterine Hypoxie beschrieben war, links die Fälle ohne intrauterine Hypoxie

Ferner wurde untersucht, ob Zusammenhänge zwischen dem pH-Wert des Nabelschnurblutes ( $7,3 \pm 0,082$ , n = 280) und dem AT2R in der Plazenta bestehen. Es zeigte sich eine negative Beziehung zwischen dem pH-Wert des Nabelschnurblutes und der plazentaren AT2R-Expression: ( $r^2 = 0,015$ , p = 0,039, n = 280).

Zur besseren Darstellung wurde das Kollektiv nach Median des pH-Werts in zwei Gruppen geteilt ( $\text{pH} > 7,3$  und  $\text{pH} \leq 7,3$ ). Hier wurde mittels Mann-Whitney-U-Test ebenfalls ein signifikanter Zusammenhang gefunden ( $p = 0,009$ ,  $n = 280$ ):

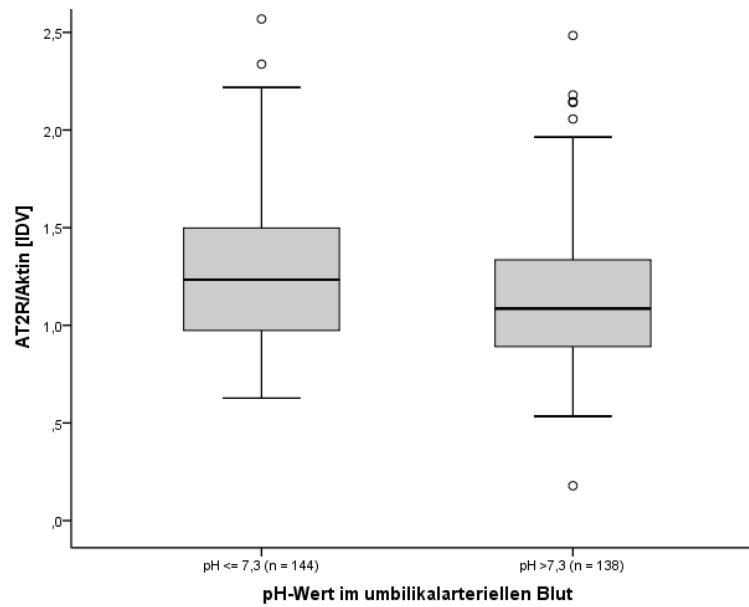


Abbildung 14: Boxplot zum Zusammenhang zwischen der postpartalen, plazentaren AT2R-Expression und dem pH-Wert im umbilicalarteriellen Blut, links bei einem pH  $\leq 7,3$ , rechts bei einem pH von  $> 7,3$

### 3.2.6 Assoziation zu mütterlichen Parametern

Die mütterlichen Parameter, welche auf einen Zusammenhang mit dem plazentaren AT2R hin untersucht wurden, sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

<b>Parameter</b>	<b>p-Wert</b>	
Alter	0,7	n = 281
Körpergröße	0,46	n = 281
BMI am Beginn der Gravidität	0,52	n = 276
Gewicht im dritten Trimenon	0,9	n = 278
Anzahl der Geburten	0,57	n = 278
Anzahl der Gravida mit dieser	0,2	n = 281
Erstgravidität j/n	0,006	n = 281
Rauchen während der Gravidität j/n	0,45	n = 281
Packyears vor der Gravidität	0,75	n = 279
Zigaretten pro Tag während der Gravidität	0,36	n = 273
Diabetes Mellitus während der Gravidität j/n	0,2	n = 280

Tabelle 8: Ergebnisse der Untersuchung von plazentarem AT2R und den mütterlichen Parametern

Es fand sich ein Zusammenhang zwischen dem Vorliegen einer Erstgravidität und dem placentaren AT2R ( $p = 0,006$ ,  $n = 282$ ). Die Mütter, bei denen eine Erstgravidität vorlag wiesen eine höhere placentare AT2R Expression auf.

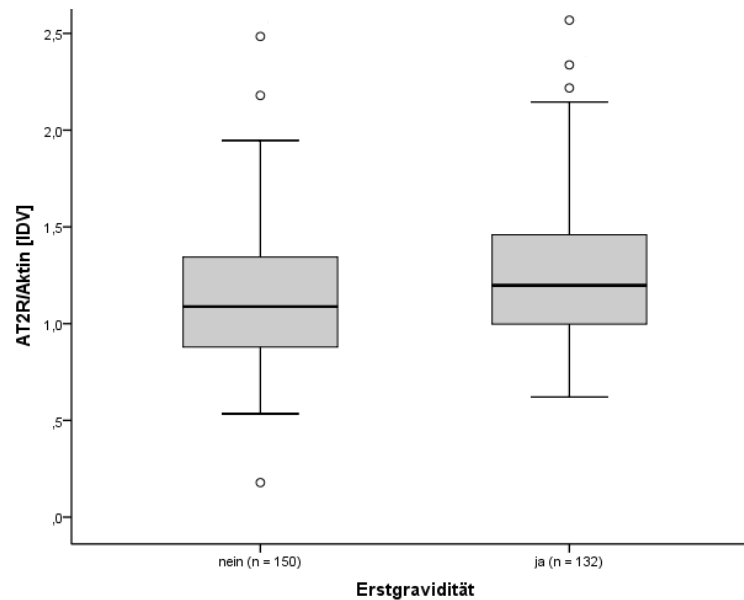


Abbildung 15: Boxplot zum Zusammenhang zwischen der placentaren AT2R-Expression und dem Vorliegen einer Erstgravidität

Es wurde überprüft, ob sich ein Zusammenhang zwischen dem placentaren AT2R und der Anzahl der Schwangerschaften darstellen lässt. Hier fand sich kein signifikanter Zusammenhang ( $p = 0,44$ ,  $n = 281$ ).



Es wurde zusätzlich getestet, ob zwischen dem Vorliegen einer Erstgravidität und dem Alter ein Zusammenhang besteht. Es fand ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Vorliegen einer Erstgravidität und dem Alter der Mütter ( $p < 0,001$ ,  $n = 281$ ). Die Mütter, bei denen eine Erstgravidita bestand waren signifikant jünger als Mütter, welche zuvor bereits mindestens einmal schwanger waren.

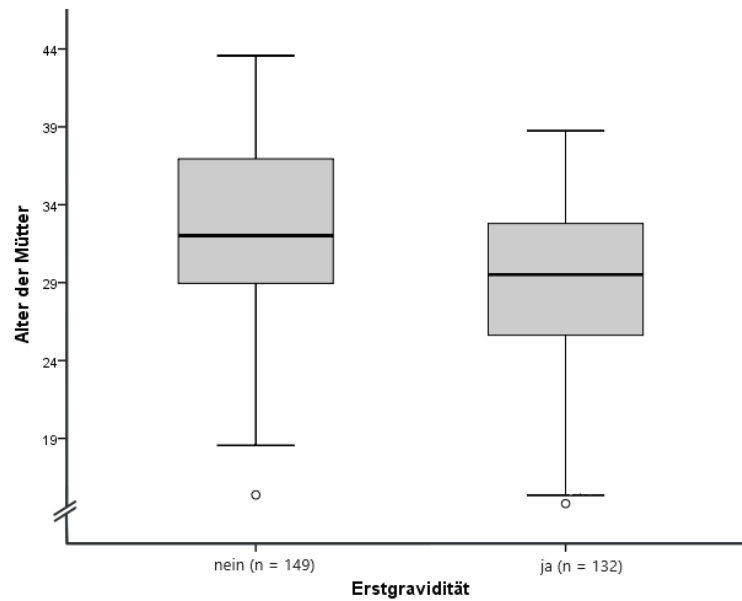


Abbildung 16: Boxplot zum Zusammenhang zwischen dem Vorliegen einer Erstgravidität und dem Alter der Schwangeren

## 3.2.7 Assoziation zu Symptomen in Zusammenhang mit Präeklampsie

### 3.2.7.1 Proteinurie

Es wurde nach einem Zusammenhang zwischen dem plazentaren AT2R und einer bestehenden Proteinurie während der Gravidität als Zeichen einer vorliegenden Präeklampsie gesucht. Bei 76 von 244 Probanden wurde während der Schwangerschaft in den Krankenunterlagen eine Proteinurie dokumentiert. Als Proteinurie wird in der Regel das Auftreten einer Proteinmenge von mindestens 150mg im über 24 Stunden gesammelten Urin bezeichnet. Bei der statistischen Analyse von AT2R in der Plazenta und dem Vorliegen einer Proteinurie wurde kein signifikanter Zusammenhang gefunden ( $p = 0,078$   $n = 244$ ).

Bei der Betrachtung verschiedener Zeitpunkte der Gravidität zeigten sich signifikante Zusammenhänge zwischen plazentarem AT2R und dem Vorliegen einer Proteinurie:

Es ließen sich mittels Mann-Whitney-U-Test entsprechende signifikante Zusammenhänge im ersten Trimenon ( $p = 0,019$   $n = 231$ ) sowie in der 21. bis 30. Schwangerschaftswoche ( $p = 0,017$   $n = 262$ ) darstellen.

Bei den Schwangeren, welche von einer Proteinurie betroffen waren, zeigte sich eine jeweils höhere plazentare AT2R-Expression als bei denen ohne Proteinurie.

Zeitraum	p-Wert	Vorliegen einer Proteinurie [%]	
1. Trimenon	0,021	10	n = 231
2. Trimenon	0,09	13	n = 261
3. Trimenon	0,4	27,7	n = 253
1. bis 10. Schwangerschaftswoche	0,1	7,8	n = 167
11. bis 20. Schwangerschaftswoche	0,27	10,7	n = 253
21. bis 30. Schwangerschaftswoche	0,003	15,3	n = 262
31. bis 40. Schwangerschaftswoche	0,68	24,2	n = 244

Tabelle 9: Zusammenhang zwischen dem Vorliegen einer Proteinurie und dem Zeitpunkt des Auftretens

### 3.2.7.2 Hypertonie

Bei 25 von 280 untersuchten Probandinnen wurde während der Schwangerschaft eine arterielle Hypertonie dokumentiert. Es wurde untersucht, ob zwischen dem plazentaren AT2R und dem Bestehen einer arteriellen Hypertonie während der Schwangerschaft ein Zusammenhang besteht. Hierbei fand sich kein signifikanter Zusammenhang ( $p = 0,117$ ,  $n = 280$ ).

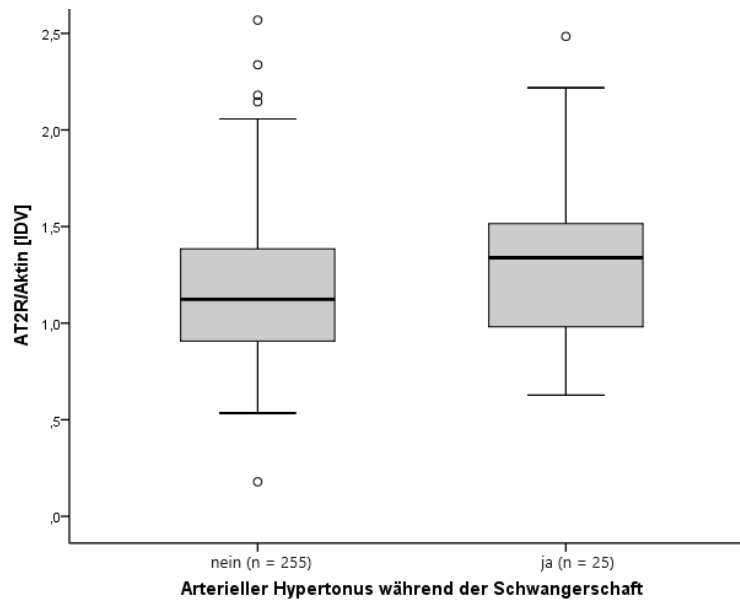


Abbildung 17: Boxplot zum Zusammenhang zwischen dem Vorliegen eines arteriellen Hypertonus und dem plazentaren AT2R

### 3.2.7.3 Ödeme

Bei 120 von 276 untersuchten Probandinnen traten zu einem Zeitpunkt der Schwangerschaft Unterschenkelödeme auf. Es wurde untersucht, ob zwischen dem Auftreten von Ödemen während der Schwangerschaft und dem plazentaren AT2R ein Zusammenhang besteht. Es fand sich kein signifikanter Zusammenhang ( $p = 0,23$ ,  $n = 276$ ). Auch bei der Untersuchung verschiedener Abschnitte der Schwangerschaft zeigten sich keine signifikanten Zusammenhänge zwischen dem plazentaren AT2R und dem Auftreten von Ödemen. Hierzu wurde das Auftreten von Ödemen pro Trimenon, pro 10 Schwangerschaftswochen sowie pro Schwangerschaftshälften berücksichtigt.

### 3.2.7.4 Präeklampsie

Bei 11 der 25 Probandinnen, bei denen während der Schwangerschaft ein arterieller Hypertonus dokumentiert wurde, wurde gleichzeitig eine Proteinurie festgestellt. Es wurde untersucht, ob zwischen placentarem AT2R und dem Vorliegen dieser beiden Symptome einer Präeklampsie ein Zusammenhang besteht. Es stellte sich ein signifikanter Zusammenhang dar ( $p = 0,039$ ,  $n = 243$ ).

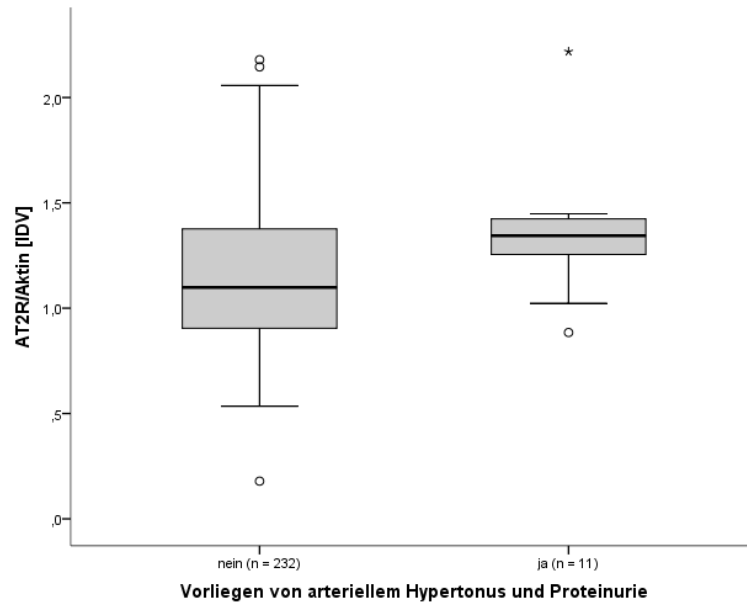


Abbildung 18: Boxplot zum Zusammenhang zwischen placentarem AT2R und dem Vorliegen der Symptome einer Präeklampsie, links Fälle ohne Symptome einer Präeklampsie, rechts Fälle mit Symptomen einer Präeklampsie

Bei Probandinnen, bei denen die zwei Symptome einer Präeklampsie, Proteinurie und arterieller Hypertonus vorlagen zeigte sich eine höhere AT2R-Expression in der Plazenta. Unter Einbeziehung des Auftretens von Unterschenkelödemen während der Schwangerschaft liessen sich keine weiteren Zusammenhänge darstellen.

### **3.3 Assoziation mit dem AT1 Rezeptor**

Es gibt Hinweise darauf, dass sich AT1 und AT2 Rezeptoren in ihrer Expression gegenseitig beeinflussen. Der AT2R kann eine verminderte Expression von AT1a vermitteln, während bei AT1-Blockade eine Steigerung der AT2-Expression beobachtet wurde (102,103).

Der Mittelwert für die zum Aktin relative AT1R-Konzentration betrug  $1,03 \pm 0,28$  (n=281). Die mittlere Ratio AT1R vs. AT2R betrug 0,92 in der gesamten Kohorte. Bei den Graviden, bei denen während der Schwangerschaft ein arterieller Hypertonus vorlag, betrug die Ratio 0,87 (n = 25) und bei den gesunden 0,93 (n = 256). Der Unterschied der Ratios von Gebärenden mit und denen ohne arteriellen Hypertonus ist nicht signifikant ( $p = 0,279$ , n = 279).

## **4 Diskussion**

### **4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse**

#### **4.1.1 AT2R Expression in der Plazenta**

Der AT2R konnte in der Plazenta mit einer mittleren Proteinkonzentration von 1,26 relativ zur plazentaren Aktinkonzentration nachgewiesen werden. Es fand sich eine signifikant höhere Expression des AT2R im Vergleich zum AT1R ( $1,25 \pm 0,52$  vs.  $1,03 \pm 0,28$ ;  $p < 0,001$ ).

#### **4.1.2 Plazentarer AT2R und Parameter der fetalen Programmierung**

Es konnten keine statistisch signifikanten Korrelationen zwischen der AT2R-Expression in der Plazenta und dem Geburtsgewicht festgestellt werden. Auch bei der Überprüfung der Fälle mit Manifestation eines erniedrigten Geburtsgewichtes ( $< 2500\text{g}$ ) konnten keine statistisch signifikanten Zusammenhänge dargestellt werden. Als weiterer fetaler Surrogatparameter wurde der pH-Wert im Blut der Umbilicalarterie bestimmt. Hier ließ sich ein negativer Zusammenhang darstellen. Auch beim Vorliegen einer intrauterinen Hypoxie zeigte sich ein Zusammenhang zum plazentaren AT2R. Bei der Analyse weiterer, in Zusammenhang mit fetaler Programmierung gebräuchlicher Surrogatparameter ergaben sich keine Hinweise auf signifikante Zusammenhänge. Es wurden die Parameter Dauer der Gravidität, das Vorliegen einer Frühgeburt, APGAR-Score, Geburtsgröße, Kopfumfang, Plazentagewicht, Ponderalindex und Geschlecht in die Untersuchung mit einbezogen.

#### **4.1.3 Plazentarer AT2R und maternale Parameter**

Es fand sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der postpartalen, plazentaren AT2R-Expression und dem Vorliegen einer Erstgravidität. Mütter, bei denen eine Erstgravidität vorlag, zeigten im Vergleich zu Müttern, bei denen zuvor bereits mindestens eine Gravidität bestand, zeigten eine höhere plazentare AT2R-Expression. Es fanden sich keine signifikanten Zusammenhänge zwischen plazentarem AT2R und weiteren maternalen Parametern, wie dem Alter, Gewicht im dritten Trimenon, Körpergröße, BMI und dem Rauchverhalten.

#### **4.1.4 Plazentarer AT2R und Symptome in Zusammenhang mit Präeklampsie**

Die AT2R-Expression in der Plazenta zeigte signifikante Zusammenhänge mit folgenden maternalen Parametern: dem Vorliegen einer Proteinurie im ersten Trimenon sowie in der 21. bis 30. Schwangerschaftswoche. Die Zusammenhänge waren positiv: bei Vorliegen einer Proteinurie bzw. bei höheren Proteinkonzentrationen im Urin zeigten sich höhere Werte für die plazentare AT2R-Expression.

Es konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem plazentaren AT2R und dem Vorliegen eines arteriellen Hypertonus während der Schwangerschaft nachgewiesen werden.

Bei gleichzeitigem Vorliegen einer Proteinurie und eines arteriellen Hypertonus, dem formalen Vorliegen einer Präeklampsie zeigte sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zum plazentaren AT2R. Bei den betroffenen Probandinnen fand sich eine höhere AT2R-Expression.

## 4.2 AT2R in der Plazenta

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eindeutig, dass der AT2R in der Plazenta exprimiert wird. Die mittlere relative Proteinkonzentration in den hier untersuchten Plazenten betrug 1,26 relativ zur Aktinkonzentration.

Es gilt als weitgehend akzeptiert, dass dem Verhältnis zwischen AT1- und AT2- Rezeptoren eine Bedeutung hinsichtlich der Wirkung, die ANGII über diese Rezeptoren am jeweiligen Wirkort entfaltet, zukommt (54,62). In adultem Gewebe wird überwiegend der AT1R exprimiert. Er reguliert hier eine Vielzahl von Effekten, die durch ANGII übermittelt werden. Die Expressionsrate von AT2R in adultem Gewebe fällt im Gegensatz dazu wesentlich geringer aus. In fetalem und uteroplazentarem Gewebe ist die AT2R-Expression im Gegensatz dazu wesentlich stärker ausgeprägt, was zu der Annahme führt, dass der AT2R eine wichtige Rolle in Zusammenhang mit Wachstum und Entwicklung spielt (62).

Williams et al. untersuchten den zeitlichen Verlauf der plazentaren AT2R-Expression während der Gravidität. Sie konnten zeigen, dass die AT2R-Expression in der Plazenta im Verlauf der Gravidität abnimmt. Sie untersuchten Plazentaprobe, die an verschiedenen Zeitpunkten der Schwangerschaft gewonnen wurden: nach Abruptio zwischen der 8. und 10. SSW, zwischen der 12. und 14. SSW sowie nach Geburten am Termin. Es fand sich ein signifikanter Abfall der plazentaren AT2R-Expression sowohl zwischen 8. bis 10. SSW und Termingeburten sowie zwischen 12. bis 14. SSW und Termingeburten (104).

Während hier Änderungen der plazentaren AT2R-Expression im Verlauf der Schwangerschaft nachgewiesen wurden, konnte demgegenüber in anderen Studien gezeigt werden, dass die plazentare AT1R-Expression über die gesamte Dauer der Gravidität relativ konstant bleibt (54). Unter der Voraussetzung, dass das Verhältnis zwischen AT1R und AT2R letztendlich für die Wirkung des AT1R bedeutsam ist, dürfte eine alleinige Änderung der plazentaren AT2R-Expression einen bedeutenden Einfluss auf die resultierende Wirkung der plazentaren ATR zur Folge haben.

Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde auch in dieser Arbeit das Verhältnis der Rezeptorsubtypen und dessen Einfluss auf ihre Gesamtwirkung untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass die Expression des AT2R die des AT1R im gesamten Kollektiv übertraf ( $1,25 \pm 0,52$  vs.  $1,03 \pm 0,28$ ,  $p < 0,001$ ). Das plazentare Verhältnis zwischen AT2R : AT1R bei gesunden Frauen betrug in unserem Versuch 1: 0,92, was im Einklang mit dem Ergebnis der Arbeit von Judson et al. steht. In deren Arbeit zeigte sich ebenfalls ein Überwiegen des AT2R in der Plazenta



von gesunden Müttern. Das Verhältnis von AT2R: AT1R betrug bei Judson et al. 1 : 0,62 (91).

Des Weiteren finden sich Tierstudien, welche ebenfalls eine, im Vergleich zum AT1R, höhere AT2R-Expressionen in der Plazenta von gesunden Versuchstieren nachweisen konnten. In den Plazenten von Schweinen (52) und Kaninchen (105) wurden höhere AT2R-Expressionen im Vergleich zum AT1R gemessen. Bei *Schauser et al.* z. B. fanden sich, verglichen mit dem AT1R, ebenfalls höhere AT2R-Expressionen in der Plazenta von Rindern (106). Die genauere Untersuchung der Verteilung der einzelnen Subtypen in der Plazenta, ergab bei *Schauser et al.*, dass vergleichbar mit der humanen Plazenta, der AT2R vor allem in den fetalen Anteilen vorkommt, während in den maternalen Anteilen vermehrt der AT1R zu finden ist. dass der AT1R vor allem im maternalen Anteil vorkommt, wurde auch bereits in anderen Arbeiten bestätigt, wie z.B. in der von *Li et al.* (48).

#### **4.2.1 Störungen der ATR-Balance**

In dieser Arbeit wurde zwischen gesunden, graviden Frauen und jenen, bei denen während der Gravidität eine arterielle Hypertonie bestand kein signifikanter Zusammenhang mit dem plazentaren AT2R festgestellt. Es zeichnete sich lediglich eine Tendenz zu einer höheren AT2R-Expression bei den Probandinnen ab, bei denen sich eine Hypertonie manifestiert hatte.

Die Präeklampsie als eine Schwangerschaftserkrankung, welche mit Hypertonie einhergeht, wurde bereits in der Einleitung beschrieben. In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass das RAS eine bedeutende Rolle bei der Entstehung dieser Erkrankung spielt (94). Während einer physiologischen Gravidität nimmt die Expression der einzelnen RAS-Komponenten im maternalen Gefäßsystem zu, während gleichzeitig die Sensitivität für die vasopressorischen Effekte, welche durch das RAS vermittelt werden, abnimmt. Durch die verringerte Sensitivität zeigt sich keine signifikante Veränderung des maternalen Blutdrucks im Schwangerschaftsverlauf bzw. es konnte in Abhängigkeit der Menge an zirkulierendem ANGI II eher ein Abfall des Blutdrucks beobachtet werden (107–109).

Da die vasokonstriktorischen Eigenschaften des RAS hauptsächlich durch die speziellen ATR-Rezeptoren vermittelt werden, ist es wahrscheinlich, dass auch die Expression der vaskulären AT1R und AT2R eine wichtige Rolle bei der Verminderung der kontraktilen Wirkung von ANGI II während der Gravidität spielen und auch am Pathomechanismus der Präeklampsie beteiligt sind.

So konnten bei der Manifestation einer Präeklampsie im Gegensatz zur normalen Schwangerschaft eine Steigerung der Reagibilität des AT1R gegenüber von Komponenten des RAS beobachtet werden (110,111). In diesem Zusammenhang konnten bereits Veränderungen der molekularen Struktur des

AT1R beim Vorliegen einer Präeklampsie beobachtet werden: in unauffälligen Schwangerschaften, bei denen eine physiologisch verringerte Sensitivität gegenüber den verschiedenen RAS-Komponenten vorliegt, liegt der AT1R in seiner monomeren Struktur vor. Eine Bindung von ROS ist hier in der Lage den AT1R zu deaktivieren. Beim Patienten mit Präeklampsie findet sich demgegenüber häufig die heterodimere Form im Verbund mit dem Bradykinin-Rezeptor, welche eine Resistenz gegenüber der ROS-Inaktivierung aufweist und dadurch mit einer Hypersensitivität auf die Bindung von ANGII einhergeht (112). Des Weiteren wurde ein Zusammenhang zwischen dem Vorliegen einer Präeklampsie und dem Auftreten von AT1R-Autoantikörpern beobachtet, welche durch ihre Bindung zu einer Stimulation des AT1R führen (94,96).

Zusammenhänge zwischen der Manifestation von Symptomen einer Präeklampsie und dem plazentaren AT2R wurden bereits in anderen Studien untersucht: Judson et al. z. B. verglichen AT1R- und AT2R-Expressionen in der Plazenta bei Probandinnen mit der Manifestation eines Hypertonus, eines der Symptome einer Präeklampsie mit der von Gesunden. Sie bestimmten in ihrer Arbeit den Gehalt an AT1R und AT2R in 22 humanen Plazenten. 11 der untersuchten Plazenten stammten von gesunden Patientinnen, die anderen 11 von Patientinnen, welche einen Schwangerschaftshypertonus aufwiesen. Die Bestimmung erfolgte durch immunhistochemische Markierung von ATR und anschließender Auszählung von Bereichen mit hohem ATR-Gehalt im histologischen Präparat. Nach der Auszählung verglichen sie den Gehalt von AT1R und AT2R.

Im Ergebnis überwog bei den gesunden Frauen die plazentare AT2R-Expression gegenüber der des AT1R im Verhältnis 1 : 0,62. Auch das Ergebnis unserer Untersuchung zeigte ein Überwiegen der plazentaren AT2R-Expression gegenüber der von AT1R (1 : 0,92). Bei Manifestation einer graviditätsbedingten Hypertonie fand sich bei Judson et al. hingegen ein Überwiegen des AT1R. Die Autoren sprachen in ihrer Arbeit bereits von einer starken Evidenz, die darauf hindeutet, dass eine bestimmte Balance zwischen den beiden Rezeptorsubtypen in den Plazenten gesunder Mütter hinsichtlich der resultierenden Wirkung von ANGII von Bedeutung ist. Dass das Verhältnis von AT2R und AT1R bedeutend ist, für den Nettoeffekt, den der jeweilige Rezeptorsubtyp im Zielgewebe ausübt wurde bereits von anderen Autoren angedeutet (72,113). Judson et al. beschrieben in Zusammenhang mit ihren Untersuchungsergebnissen eine gestörte Balance zwischen den Rezeptorsubtypen (91). Diese Beobachtung zeigte sich in unserem Versuch nicht. Bei Frauen mit einem manifestem arteriellem Hypertonus während der Schwangerschaft betrug das Verhältnis AT2R: AT1R in unserer Untersuchung 1 : 0,87. Die Expression des AT2R überwog also auch in den Plazenten dieser Schwangeren. Dieses Ergebnis würde somit dem von Judson et al. widersprechen. Aufgrund der relativ geringen Fallzahl an Gebärenden mit Hypertonus während der Schwangerschaft in unserer Studie (n = 25), sollte unser Ergebnis nur zurückhaltend interpretiert werden. Des Weiteren ist die

Vergleichbarkeit möglicherweise durch sich unterscheidende Quantifizierungsmethoden eingeschränkt. Die quantitative Bestimmung durch Judson et al. erfolgte im mikroskopischen Präparat. Es wurden Bereiche mit hohem ATR-Anteil ausgezählt, welche zuvor mit AT1R- und AT2R-Antikörpern dargestellt wurden. In unserer Untersuchung erfolgte die Bestimmung mittels Gelelektrophorese und Westernblot, sowie anschließender Übertragung auf Fotopapier und densitrometrischer Expressionsbestimmung. Ein quantitativer Vergleich zwischen den AT2R-Expressionen von gesunden Müttern und denen von Müttern mit arterieller Hypertonie während der Gravidität fand bei *Judson et al.* nicht statt. Unser Ergebnis steht offenbar im Widerspruch zu dem von *Judson et al.*, die eine Umkehr im Verhältnis von AT1R und AT2R darstellen konnten, welche sich in unserem Versuch nicht zeigte.

Eine Studie, welche im Tierversuch Hinweise für einen Einfluss des plazentaren AT2R auf die plazentare Durchblutung und eine Bedeutung des Verhältnisses zwischen AT1R und AT2R in Zusammenhang mit der Ausbildung einer Präeklampsie zeigte, stammt von *Matsurbata et al.* (63). In dieser Untersuchung wurde der Blutdruckverlauf während der Trächtigkeit von AT1R null Mäusen einerseits und AT2R null Mäusen andererseits bestimmt. Bei den AT1R null Mäusen zeigte sich im Vergleich mit Wildtypmäusen ein Blutdruckabfall im zweiten Trimester der Tragzeit. Bei AT2R null Mäusen wurde ein Anstieg des Blutdrucks ab dem dritten Trimester gezeigt. Der AT2R konnte vor allem in den Zellen glatter Gefäßmuskulatur der Umbilikalgefäße und denen der Plazenta dargestellt werden, während er im adulten Gefäßsystem nur in sehr geringer Konzentration nachzuweisen war. *Matsubara et al.* bestimmten zusätzlich die Expression von AT1R und AT2R in der maternalen Niere. Hier ließen sich während der Tragzeit keine Veränderungen der AT2R-Expressionen feststellen. Die Ergebnisse deuten somit auf einen Zusammenhang des maternalen Blutdrucks mit Veränderungen der ATR-Expression hin, deren Ursache auf einen relativ höheren Anteil des AT2R allein in den umbilikal- und plazentaren Gefäßen zurückzuführen ist. Im Gegensatz dazu konnte in anderen Versuchen an adulten, nichtträchtigen Tieren kein Zusammenhang zwischen dem AT2R und der Manifestation eines arteriellen Hypertonus nachgewiesen werden. *Brede et al.* konnten im Tierexperiment zeigen, dass sich bei AT2R-KO Mäusen der durchschnittliche Blutdruck im Vergleich zu Wildtyp Mäusen nicht veränderte (114). Auch *Barber et al.* fanden in Versuchen mit arteriell hypertensiven Ratten, denen sie den AT2R-Agonisten CGP42112 infundierten, keine signifikanten Veränderungen des Blutdrucks (115).

Die Unterschiede in den Ergebnissen der nichtträchtigen im Vergleich zu den Blutdruckverläufen an trächtigen Versuchstieren könnten hier einen Hinweis auf Unterschiede in der Funktion und der Bedeutung der AT2R, sowie der Bedeutung des plazentaren RAS hinsichtlich des Blutdruckverhaltens liefern, der sich während der Tragzeit manifestiert. Hier können die bereits

beschriebenen Veränderungen hinsichtlich des Blutdruckverlaufs und der mit der Tragzeit assoziierten RAS-Aktivierung und der damit einhergehenden Bedeutung des AT2R am Blutdruckverhalten im Rahmen der AT1R / AT2R Balance eine wichtige Rolle spielen.

## 4.3 Kindliche Parameter, fetale Programmierung

### 4.3.1 Geburtsgewicht

Es konnte kein Zusammenhang zwischen dem AT2R in der Plazenta und dem Geburtsgewicht festgestellt werden. Auch bei Berücksichtigung, ob beim Neugeborenen ein Untergewicht vorlag (Geburtsgewicht < 2500g) zeigte sich keine Korrelation. Weitere Analysen wurden mit anderen vorliegenden kindlichen Parametern durchgeführt. Hierzu zählten Geburtsgröße des Kindes und das Plazentagewicht. Um den klinischen Zustand des Neugeborenen in die Analyse aufzunehmen, wurde zusätzlich der APGAR-Score herangezogen. In allen Analysen zeigte sich unabhängig von der Dauer der Schwangerschaften kein Zusammenhang zwischen kindlichen Parametern zur AT2R-Konzentration.

Dieses Ergebnis steht in Einklang mit Ergebnissen aus Versuchen am Tiermodell, wie dem von *Lamparter et al. (89)*. Bei *Sherman et al.* fand sich in diesem Zusammenhang eher ein Zusammenhang mit dem AT1R. So fand sich bei Nachkommen von Muttertieren, welche während der Tragzeit proteinarm ernährt wurden ein verringertes Geburtsgewicht. Präpartal fielen die Muttertiere durch einen Blutdruckanstieg auf, welcher sich mit AT1R-Antagonisten behandeln ließ (116). Hinweise auf eine im Vergleich zum AT1R geringere Bedeutung des AT2R in der Plazenta hinsichtlich des Geburtsgewichtes lieferten *Knock et al.* ANGII übte demnach in erster Linie über seine Wirkung am AT1R einen Einfluss auf den fetoplazentaren Blutfluss und die plazentare Perfusion aus und beeinflusste damit das Auftreten von Wachstumsstörungen und Präeklampsie (117).

Ein Einfluss von AT2 auf plazentares Wachstum und die fetale Entwicklung ist durch Tier- und Humanstudien belegt (94,117). Auch, der Einfluss von AT2 auf das intrauterine Wachstum konnte in anderen Studien gezeigt werden (48,94). Das Verhältnis zwischen dem vasokonstriktiv wirkenden AT1R und dem eher vasodilatativ wirkenden AT2R zeigte sich in mehreren Studien für den Netto-Effekt bedeutsam, welchen AT2 letztendlich im Zielgewebe ausübt (72,113). Aufgrund dieser Aussagen erscheint das von uns beobachtete Ergebnis widersprüchlich. Es deckt sich aber mit den Ergebnissen anderer Untersuchungen: *Li et al.* z.B. fanden eine signifikant verminderte Expression der plazentaren AT1R bei Kindern, bei denen es aufgrund einer fehlerhaften Plazentation zu einer intrauterinen Wachstumsretardierung gekommen war. Die AT2R Expression zeigte keine Verminderung (48). Als eine mögliche Ursache für die geringere AT1R-Expression wurde eine chronische Aktivierung des plazentaren Renin-ANG-Systems genannt. Das Ergebnis lässt darauf schließen, dass diese Aktivierung des Renin-ANG-Systems auf die AT2R-Expression kaum einen messbaren Effekt ausübt. Der AT2R spielte damit auch bei dieser Form der Wachstumsminde-

eine weniger bedeutsame Rolle. Das Ergebnis unserer Untersuchung steht im Einklang mit dieser Aussage.

Andererseits lassen weitere Untersuchungen darauf schließen, dass der maternale Ernährungsstatus einen Einfluss auf die Expression des AT2R in verschiedenen anderen Gewebearten der Nachkommen hat. In mehreren Studien konnte bereits ein Zusammenhang zwischen Proteinmangelernährung und AT2R-Expression nachgewiesen werden. In tierexperimentellen Arbeiten mit Ratten, zeigte sich eine signifikante Verringerung der renalen AT2R-Expression bei Jungtieren, deren Muttertiere während der Tragzeit eine proteinreduzierte Ernährung erhalten hatten (84,118). Ein Einfluss von Malnutrition auf die AT2R-Expression in renalem Gewebe der Nachkommen als auch auf das Geburtsgewicht der Nachkommen ist also mehrfach belegt (84,116,118). In der vorliegenden Kohorte ließen sich Aussagen über den Ernährungszustand der Neugeborenen präpartal durch das Gewicht und den BMI der Mütter sowie postpartal durch die Geburtsgewichte der Kinder erfassen. Eine unserer Fragen war, ob sich auch in plazentarem Gewebe ein Zusammenhang von AT2R und Geburtsgewicht nachweisen lässt. Dieser Zusammenhang zeigte sich nicht.

Der von anderen Autoren im Tierversuch beschriebene Zusammenhang zwischen Ernährungsstatus von Muttertieren und AT2R in den Nieren ihrer Nachkommen hat sich hier im Plazentagewebe beim Menschen nicht gezeigt. In der Niere wird AT2R bevorzugt in der Nierenrinde gefunden. Dies lässt einen Zusammenhang mit der ebenfalls beobachteten Verminderung der Nephronzahl und einer verringerten AT2R-Expression in der Niere plausibel erscheinen (61).

### **4.3.2 Schwangerschaftsdauer**

Es gilt als erwiesen, dass das RAS der Plazenta ab der frühen Schwangerschaft aktiv ist (97). In früheren Versuchen konnte gezeigt werden, dass die AT2R-Expression in der humanen Plazenta Schwankungen unterliegt, die von der Dauer der Schwangerschaft abhängig sind. In einer Untersuchung von *Williams et al.* konnte festgestellt werden, dass die Expression von humanem plazentarem AT2R bei Frauen, deren Schwangerschaft früh abgebrochen werden musste höher war, als bei denen, die regelrecht entbunden hatten. Hierzu wurde die plazentare AT2R Expression bei Probandinnen verglichen, die je nach Dauer der Schwangerschaft in drei Gruppen eingeteilt wurden: die erste Gruppe umfasste Plazenten früher Aborte zwischen der 8. und 10. Schwangerschaftswoche, die zweite Gruppe mittelfrühe Aborte zwischen der 12. und 14. Woche und die dritte Gruppe mit Plazenten nach termingerechten Geburten (54). Auch in dieser Studie wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen dem plazentaren AT2R und der Dauer der Graviddität untersucht. In dem

Vergleich der plazentaren AT2R-Expression und dem Geburtstermin, welcher in Schwangerschaftswochen dokumentiert war, zeigten sich keine signifikanten Zusammenhänge. Zusätzlich wurden die Fälle in zwei Gruppen eingeteilt, je nachdem ob eine Frühgeburt bis zur vollendeten 37. SSW vorlag oder ob die Geburten zu einem späteren Zeitpunkt stattfanden. 16 Fälle in der Kohorte waren von einer Frühgeburt betroffen. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der plazentaren AT2R-Expression zwischen diesen beiden Gruppen. Zusammenfassend zeigte sich in dieser Arbeit kein Zusammenhang zwischen dem plazentaren AT2R und der Dauer der Gravidität. Ein Grund dafür könnte in den im Vergleich zu Williams et al. geringeren Unterschieden der Graviditätsdauer liegen. Während die Arbeit von *Williams et al.* neben termingerechten Geburten auch Schwangerschaftsabbrüche zu früheren Zeitpunkten der Gravidität umfasste und den Verlauf der plazentaren AT2R von früheren Stadien der Schwangerschaft an darstellen konnte, umfasste diese Arbeit ausschließlich Geburten im lebensfähigen Alter, die damit zeitlich relativ nahe am physiologischen Geburtstermin lagen. Unsere Arbeit zeigte somit ausschließlich den statischen Zustand der Plazenta, wie er zum Ende einer natürlichen Geburt vorliegt. Darüber hinaus lag in der hier untersuchten Kohorte mit  $n = 16$  eine zur Gesamtzahl relativ geringe Anzahl an Frühgeburten vor, was die Vergleichbarkeit der Studien weiter einschränkt. Des Weiteren können die unterschiedlichen Methoden der Quantifizierung einen Einfluss auf die verschiedenen Studienergebnisse gehabt haben: *Williams et al.* bestimmten die AT2R-Expression nach Antikörpermarkierung, Anfärbung und nachfolgender Auszählung am histologischen Präparat, während in unserer Arbeit die Bestimmung mittels Elektrophorese und Westernblot durchgeführt wurde.

### **4.3.3 pH-Wert im Blut der Umbilicalarterie**

Auf Zusammenhänge zwischen Hypoxie und der RAS-Aktivität in verschiedenen Zellverbänden konnte bereits in anderen Arbeiten hingewiesen werden. Die Literatur bietet hierzu ein zum Teil uneinheitliches Bild. *Cervenka et al.* fanden im Tiermodell mit transgenen, arteriell hypertensiven Ratten, die einer chronischen Hypoxie ausgesetzt waren, eine Supprimierung des systemischen RAS (119). Demgegenüber konnten *Sun et al.* bei akuter Hypoxie in männlichen Personen eine systemische RAS-Aktivierung darstellen. Die RAS-Aktivität der Probanden wurde vor und nach einem Aufstieg von Meeresspiegelhöhe auf 4500m bestimmt (120). *Mao et al.* verglichen im Versuch an trächtigen Schafen die AT2R-Expression in Nieren von Feten, deren Muttertiere in Höhe des Meeresspiegels lebten mit der von Feten, die 3800m höher ausgetragen wurden und damit einer chronischen Hypoxie ausgesetzt waren. Die chronische Hypoxie stand in Zusammenhang mit einer

Verringerung der Expression von AT2R und AT2R mRNA in den Nieren der Feten (101). *Kurlak et al.* bestimmten die Expression von AT2R in Plazentagewebe bei Frauen die in über 3000m Höhe sowie bei Frauen, welche auf Meereshöhe entbunden hatten. Bei den Frauen, die in großer Höhe entbunden und dabei einer Hypoxie ausgesetzt waren, fand sich im Plazentagewebe eine höhere AT2R- Expression im Vergleich zu denen auf Meereshöhe (121). *Cuffe et al.* untersuchten die AT2R mRNA-Expression in den Plazenten von Mäusen, die zum Ende der 18tägigen Tragzeit einer 4tägigen Hypoxie ausgesetzt waren. Hier fanden sich im Vergleich zu Kontrolltieren unter normoxischen Bedingungen eine tendenziell höhere AT2R-mRNA-Expression ohne statistische Signifikanz (122).

In unserer Arbeit zeigten sich in den Plazenten von Geburten, bei denen es laut Krankenakte einer intrauterinen Hypoxie unter der Geburt kam, eine signifikant höhere AT2R-Expression ( $p = 0,036$ ,  $n = 120$ , Hypoxie bei 5% der Fälle).

Unser Ergebnis deutet somit, wie auch die Ergebnisse der oben dargestellten Arbeiten, auf einen Zusammenhang zwischen Hypoxie und RAS-Aktivität hin. Auch Veränderungen in der AT2R-Expression konnten sowohl in unserer als auch in der überwiegenden Zahl der oben dargestellten Arbeiten gezeigt werden. In unserer Untersuchung fand sich eine Erhöhung der plazentaren AT2R-Expression bei Vorliegen einer Hypoxie. *Mao et al.* beobachteten eine Verringerung der AT2R-Expression in den fetalen Nieren von Schafen bei Hypoxie. Unser abweichendes Ergebnis muss in diesem Zusammenhang keinen Widerspruch darstellen. Es kann vielmehr Hinweise auf Unterschiede in den Adaptionsvorgängen liefern welche spezies- oder gewebespezifisch sind. Wie bei *Kurlak et al.* vorbeschrieben wurde auch hier im Zusammenhang mit Hypoxie eine erhöhte AT2R-Expression in der Plazenta beobachtet. Es lässt sich diskutieren, welchen Einfluss die Ursache der Hypoxie bei den Veränderungen des plazentaren RAS spielt: bei *Kurlak et al.* waren die Mütter von der Hypoxie betroffen, in unserer Arbeit ausschließlich die Feten. Auch die Ursache der AT2R-Veränderung ist unklar. Möglicherweise besteht ein Zusammenhang mit den eher gefässprotektiven Eigenschaften des AT2R und seiner Rolle bei der Reparatur und Regeneration von verletztem Gefässendothel (121). Andererseits kann es sich bei den Veränderungen der AT2R-Expression um kompensatorische Veränderungen handeln, die in Zusammenhang stehen mit Veränderungen der plazentaren AT1R-Expression (121). Hypoxie führt darüber hinaus zu einer Vasodilatation in den meisten Strombahnen (123). Dem AT2R wurde die Beteiligung an eher vasodilatativen Vorgängen nachgewiesen. Jedoch erscheint aufgrund der Trägheit, mit welcher sich die Änderungen der AT2R-Expression vollziehen ein Zusammenhang vor allem bei einer chronischen Hypoxie wahrscheinlich.

Zwischen pH-Wert des umbilicalarteriellen Blutes und Auftreten einer Hypoxie fand sich eine deutliche Korrelation ( $r^2 = 0,146$ ,  $p < 0,001$ ,  $n = 120$ ). Die Neugeborenen mit dokumentierter



intrauteriner Hypoxie hatten signifikant niedrigere pH-Werte im Nabelschnurblut. Weiter wurde untersucht, ob sich ein Zusammenhang zwischen dem pH-Wert der Nabelarterie und dem plazentaren AT2R darstellen lässt. Es ergab sich ebenfalls ein signifikanter Zusammenhang ( $r^2 = 0,022$ ,  $p = 0,013$ ,  $n = 280$ ). Bei Neugeborenen mit geringerem pH-Wert im Nabelschnurblut fand sich eine höhere AT2R-Expression in der Plazenta.

Zum Zusammenhang zwischen dem pH-Wert im umbilicalarteriellen Blut und dem AT2R in der Plazenta konnten in der Literatur keine weiteren Arbeiten gefunden werden. Eine unter der Geburt bestehende Hypoxie führt über eine anaerobe Glycolyse und die Anhäufung von Lactat im Stoffwechsel zur Übersäuerung des Organismus, was sich in einem erniedrigtem pH-Wert nachweisen lässt (124). Der Zusammenhang zwischen Hypoxie und einem erniedrigtem pH-Wert als Ausdruck einer Lactatazidose erscheint hier also plausibel.

Das RAS ist in der Lage einen Einfluss auf den pH-Wert des Blutes auszuüben. Dies geschieht hauptsächlich über seine Komponente Aldosteron, welches in den Sammelrohren der Niere u.a. die Ausscheidung von Protonen fördert. Eine metabolische Azidose führt zu einer Steigerung der Aktivität des RAS (125). Angiotensin steigert die Ausschüttung von Aldosteron und führt auf diesem Weg zu einem Anstieg des pH-Wertes im Blut (125). Auch eine Beeinflussung der AT2R-Expression durch eine metabolische Azidose wäre somit wahrscheinlich. Die Beeinflussung des pH-Wertes im Blut durch das RAS geschieht sehr träge, so dass eine Beeinflussung des pH-Wertes vorwiegend bei chronischer Hypoxie eine Rolle spielen dürfte. Laut *Sun et al.* spielt das RAS möglicherweise eine wichtige Rolle bei der Transformation von akuter in eine chronische Hypoxie.

#### **4.4 Mütterliche Parameter, Vorliegen einer Erstgravidität**

Es fand sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem postpartalen AT2R in der Plazenta und dem Vorliegen einer Erstgravidität. Die Mütter, bei denen zuvor keine weitere Gravidität bestand, zeigten eine höhere plazentare AT2R-Expression im Vergleich zu Müttern, welche zuvor bereits eine Gravidität aufwiesen. Eine Interpretation dieses Ergebnisses ist schwierig, da sich in einer Literaturrecherche hierzu keine weiteren Hinweise finden ließen. Um einen Zusammenhang mit dem Alter ausschließen zu können wurde überprüft, ob sich ein Zusammenhang zwischen dem Vorliegen einer Erstgravidität und dem Alter der Mütter nachweisen liess. Es zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Vorliegen einer Erstgravidität und dem Alter der Mütter. Die Mütter, welche eine Erstgravidiät aufwiesen, waren signifikant jünger als Mütter, welche zuvor bereits mindestens einmal schwanger waren. Auch wenn sich kein Zusammenhang zwischen dem plazentaren AT2R und dem Alter feststellen ließ, ist nicht auszuschließen, dass das Alter der Schwangeren hier doch eine Rolle spielt. Andererseits kommen Adaptationsvorgänge während der ersten Schwangerschaft in Frage, die sich auf die plazentare AT2R-Expression der folgenden Schwangerschaften auswirken. Bemerkenswert ist, dass hierbei offenbar nur die erste Schwangerschaft eine Rolle zu spielen scheint. Die Gesamtzahl der Schwangerschaften zeigte keinen Zusammenhang mit dem AT2R in der Plazenta, was darauf schließen lässt, dass wenn solche Adaptationsvorgänge ablaufen, sie während der ersten Schwangerschaft stattfinden.

## 4.5 Symptome einer Präeklampsie

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob sich ein Zusammenhang zwischen dem plazentaren AT2R und der Manifestation einer maternalen Proteinurie darstellen lässt. Proteinurie während der Schwangerschaft kann physiologisch sein. Sie kann aber auch im Rahmen von Erkrankungen auftreten und stellt ein Diagnosekriterium der Präeklampsie dar. Zu verschiedenen Zeitpunkten der Gravidität ließ sich in dieser Untersuchung ein positiver Zusammenhang zwischen der AT2R-Expression in der Plazenta und dem Vorliegen einer Proteinurie darstellen. Darüber hinaus zeigte sich in jedem Trimenon ein signifikanter Zusammenhang zwischen der plazentaren AT2R-Expression und der maternalen Proteinkonzentration im Urin. Bei Schwangeren mit aufgetretener Proteinurie, bzw. bei denen mit höheren Proteinkonzentrationen im Urin fand sich eine jeweils höhere AT2R-Expression in der Plazenta im Vergleich zu Schwangeren ohne bzw. geringeren Proteinkonzentrationen im Urin. Im Verlauf der Gravidität zeigte sich zusätzlich insgesamt eine Zunahme an Fällen mit Proteinurie in der Kohorte, was zu erwarten war.

Proteinurie ist neben Hypertonie und Ödemen eines der klassischen Diagnosekriterien für das Vorliegen einer Präeklampsie (126). Allerdings haben aktuelle klinische Studien gezeigt, dass Frauen an Präeklampsie und Eklampsie erkranken können, ohne dass eine Proteinurie festgestellt werden konnte und dass die hierdurch verursachte Fehleinschätzung der Erkrankung den Krankheitsverlauf negativ beeinflussen kann (127). Auch wenn inzwischen die massive Proteinurie nicht mehr als Diagnosekriterium der Präeklampsie gilt (128), stellt die Proteinurie selbst dennoch einen wichtigen Marker für die Schwere der Erkrankung dar (129). Mit der Proteinurie manifestieren sich bei der Präeklampsie Veränderungen an den Glomeruli der Niere. Der Zusammenhang zwischen Veränderungen am Glomerulum und der Proteinurie ist derzeit noch nicht vollständig geklärt. Das Symptom Proteinurie tritt bei anderen Nierenerkrankungen in der Regel in Zusammenhang mit einer Schädigung der Podozyten auf, die bei Proteinurie charakteristische Veränderungen aufweisen. Als Ursache dieser Veränderungen kommen entweder eine direkte Schädigung der Podozyten durch den AT2R (130), eine Schädigung des Endothels durch den AT2R (130–132), Schädigungen, die durch den AT2R über Mediatoren, wie Nephtrin (130,133,134) oder dem löslichen Endoglin (131,135,136) vermittelt werden bzw. durch eine Modifikation der ANGII Wirkung aufgrund einer Veränderung der intrarenalen AT1R/AT2R ratio (137).

Letztendlich gestaltet sich die Interpretation des in dieser Arbeit beobachteten Zusammenhanges zwischen plazentarem AT2R und maternaler Proteinurie als schwierig, da zu diesem Thema keine weiteren Arbeiten gefunden werden konnten und sich die oben aufgezählten Zusammenhänge zwischen AT2R-Funktion und der zur Entstehung einer Proteinurie beitragenden Prozesse

vorwiegend intrarenale AT2R-Funktionen betreffen. Im Speziellen ließen sich zur Proteinurie ausschließlich Studien recherchieren, welche sich entweder mit der systemischen AT2R- Expression beschäftigten oder lokale AT2R-Expressionen in anderen Organen bei Proteinurie beschrieben.

So wurde z.B. bereits über eine Beziehung zwischen Proteinurie und lokaler AT2R-Expression in Untersuchungen von Nierengewebe berichtet (138,139). Ein Beispiel liefert eine Arbeit von *Tejera et al.* in der bei heminephrektomierten Tieren bei denen eine Proteinurie induziert wurde im Vergleich zu Kontrolltieren eine signifikant höhere AT2R-Expression festgestellt werden konnte (139). Ähnlich wie von *Tejera et al.* im Tiermodell in der Niere berichtet, wurde hier bei Müttern mit Proteinurie eine höhere AT2R-Expression in der Plazenta gefunden. *Tejera et al.* führte die veränderte AT2R-Expression auf die Beteiligung an in Zusammenhang mit der Proteinurie vermehrt ablaufenden Apoptosevorgängen in den Nieren der Versuchstiere zurück. Die genaue Funktion des AT2R in der Plazenta ist bisher nicht genau bekannt. Die renale AT2R-Expression wurden in unserer Studie nicht ermittelt. Eine direkte gegenseitige Beeinflussung von renaler und plazentarer AT2R-Expression wirkt weniger plausibel als die Annahme einer gemeinsamen systemischen Ursache. In der von uns durchgeführten Studie zeigte sich ein Zusammenhang zwischen der Proteinkonzentration im maternalen Urin und der AT2R-Expression in der Plazenta *in allen Trimeni der Schwangerschaft*. Pathologisch erhöhte Proteinkonzentrationen im maternalen Urin sind ein Diagnosekriterium der Präeklampsie. Die dargestellten Zusammenhänge zeigten sich unabhängig davon, ob eine manifeste arterielle Hypertonie vorlag oder nicht.

Die arterielle Hypertonie stellt in weiteres Diagnosekriterium der Präeklampsie dar. Sie stellt die häufigste Komplikation während der Gravidität dar. 5 – 10% der Schwangeren sind von einer arteriellen Hypertonie betroffen. Eine vor der Schwangerschaft bestehende arterielle Hypertonie prädisponiert zu der Entwicklung einer Präeklampsie (140–142). Anhand der vorliegenden Kohorte wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen dem plazentaren AT2R und der Manifestation einer arteriellen Hypertonie besteht. Zwischen den Patienten, bei denen während der Schwangerschaft eine arterielle Hypertonie beobachtet wurde und gesunden fand sich in der vorliegenden Arbeit hinsichtlich des AT2R in der Plazenta kein signifikanter Zusammenhang. Dieses Ergebnis entspricht dem der Arbeit von *Adelle et al.*, welche im Tiermodell den Einfluss eines arteriellen Hypertonus auf die plazentare AT2R-mRNA-Expression untersuchten. Hierzu erzeugten sie bei trächtigen Versuchstieren einen arteriellen Hypertonus, indem sie während eines chirurgischen Eingriffs die Nieren der Muttertiere mit Zellophan umwickelten und eine Page-Niere erzeugten. Nach 28 Tagen, was einer normalen Tragzeit entspricht, wurde die plazentare AT2R-mRNA-Expression in den Plazentas mittels reverse Transkriptase PCR bestimmt und mit den von Plazentas von Kontrolltieren verglichen. In der plazentaren AT2R-mRNA-Expression zeigte sich kein signifikanter Unterschied

zwischen Tieren mit arteriellem Hypertonus und den Kontrolltieren (140). Auch in unserer Arbeit wurde kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem plazentaren AT2R und dem Vorliegen einer arteriellen Hypertonie während der Gravidität beobachtet.

Des Weiteren wurde untersucht, ob sich ein Zusammenhang zwischen dem plazentaren AT2R und dem Vorliegen beider Symptome einer Präeklampsie darstellen lässt. Es wurde die plazentare AT2R-Expression von Schwangeren, bei denen während der Gravidität ein Hypertonus und eine Proteinurie bestand mit der von Gesunden bzw. von Schwangeren verglichen, bei denen nur eines oder keines der Symptome vorlag. Es zeigte sich hier ein signifikanter Zusammenhang: bei Schwangeren, bei denen die Symptome arterielle Hypertonie und Proteinurie vorlagen zeigte sich eine signifikant höhere plazentare AT2R-Expression als bei denen, die nur eins oder keines dieser Symptome aufwiesen.

Ob sich ein Zusammenhang zwischen der Manifestation einer Präeklampsie und der plazentaren AT2R-Expression beim Menschen darstellen lässt wurde schon in anderen Arbeiten untersucht. Sowohl bei *Williams et al.* als auch *Mistry et al.* liess sich kein Zusammenhang zwischen dem plazentaren AT2R und dem Vorliegen einer Präeklampsie nachweisen (53,143). Ausgehend der Ergebnisse von *Williams et al.* und *Mistry et al.* erschien es plausibel, dass sich auch zwischen dem plazentaren AT2R und dem Vorliegen von maternaler Proteinurie und arteriellen Hypertonus, also bei Vorliegen von zwei Symptomen einer Präeklampsie kein signifikanter Zusammenhang nachweisen lässt. In Anbetracht dessen wirkt der nun dennoch beobachtete Zusammenhang widersprüchlich und sollte, auch aufgrund der relativ geringen Fallzahl an Schwangeren mit beiden Symptomen in dieser Studie vorsichtig interpretiert werden. Für eine genauere Beurteilung dieses Befundes können weitere Studien indiziert sein, welche eine mögliche Assoziation zwischen der plazentaren AT2R-Expression und maternaler Proteinurie bei manifester Präeklampsie untersuchen.

## **4.6 Schlussbetrachtungen**

### **4.6.1 Limitationen**

Das Ziel dieser Studie war die Bestimmung der humanen, plazentaren AT2R-Expression am Ende der Gravidität sowie die Suche nach möglichen Zusammenhängen zu Funktionen der genetischen Programmierung anhand verschiedener mütterlicher und kindlicher Parameter.

Das gewählte Studiendesign entsprach dem einer Assoziationsstudie, wodurch sich bestimmte Limitationen ergeben. So ist diese Studie zwar in der Lage bestimmte Zusammenhänge zwischen einer Vielzahl an verschiedenen Parametern darzustellen, Rückschlüsse auf bestimmte pathophysiologische Abläufe lassen sich daraus jedoch nicht ableiten.

Weiterhin ergeben sich Limitationen durch die Art der Datenerhebung. Mehrere der Parameter wurden durch ein strukturiertes Interview der Mütter mit Hilfe eines standardisierten Fragebogens erhoben. Die Qualität der Antworten ist somit einerseits von der Erinnerungsfähigkeit der Befragten abhängig, andererseits von der schwer überprüfbaren Authentizität der Antworten. Einige der Mütter könnten die Antworten auf eher unangenehme Fragen „geschönt“ haben. Diese Nachteile des standardisierten Fragebogens dürften jedoch teilweise durch die hierdurch mögliche hohe Fallzahl ausgeglichen worden sein.

Zur Gewinnung der Plazentaprobe erfolgte durch das Kreissaalpersonal. Aus diesen Proben wurden vor der Analyse etwa 1cm große Stücke herausgebrochen. Die letztlich für die Analyse genutzten Proben wurden lediglich makroskopisch hinsichtlich Blutbeimengung und Gewebegehalt beurteilt. Eine Homogenität der Proben auch angesichts deren Gehalt an Blutgefäßen und bindegewebigen Septen konnte daher nur begrenzt sichergestellt werden. Durch einen unterschiedlichen Gehalt an AT2R in den verschiedenen Geweben erschien hierdurch eine Verzerrung der Ergebnisse möglich. Das Ausmaß dieser Verzerrung dürfte jedoch durch die hohe Fallzahl reduziert worden sein.

## 4.6.2 Ausblick

Ziel dieser Arbeit war AT2R in der Plazenta nachzuweisen und auf Zusammenhänge mit verschiedenen Parametern zu überprüfen, welche einen Zusammenhang mit der fetalen Programmierung spielen. Es gelang AT2R in der menschlichen Plazenta nachzuweisen. Die Hypothese, dass der AT2R in der Plazenta eine Rolle in Zusammenhang mit fetaler Programmierung spielt, konnte nicht bestätigt werden.

Es wurden Hinweise auf einen schwachen Zusammenhang mit Parametern gefunden, welche eine Rolle hinsichtlich des Vorliegens einer Präeklampsie spielen. Darüber hinaus wurden Zusammenhänge mit weiteren Parametern gefunden, welche eine Rolle bei der Blutdruckkontrolle spielen. Allerdings ist aufgrund der geringen Anzahl an Patientinnen mit bekanntem Hypertonus die Aussagekraft dieser Daten recht eingeschränkt.

Hinsichtlich der genauen Funktion des AT2R und seiner Rolle bei bestimmten Erkrankungen sind nach vielen Jahren der Forschung und einer großen Anzahl an erschienen Publikationen immer noch viele Fragen offen. Diese Arbeit könnte Ansätze zu weiteren interessanten Untersuchungen bieten, die Rolle des AT2R innerhalb des RAS besser zu verstehen. Dies erscheint auch unter der Betrachtung der günstigen, gewebeprotektiven Effekte sinnvoll sowie unter dem Aspekt, dass andererseits AT1R-Blocker heutzutage zu den meistverschriebenen Medikamenten gehören.

Zur Klärung der Frage, ob und wie der AT2R eine Rolle bei Erkrankungen, die während der Schwangerschaft auftreten, wie der Präeklampsie spielt sind ebenfalls weitere Untersuchungen nötig, die mit einer höheren Anzahl an Patientinnen mit einer Hypertonie, unter Umständen auch anhand eines Hypertoniemodells durchgeführt werden. Dies könnte möglicherweise Wege zu neuen therapeutischen Möglichkeiten weisen.

## 5 Literaturverzeichnis

1. Stephens TD. Proposed mechanisms of action in thalidomide embryopathy. *Teratology*. 1988;38(3):229–39.
2. Abel EL. Prenatal effects of alcohol. *Drug Alcohol Depend*. September 1984;14(1):1–10.
3. Langley-Evans SC. Nutrition in early life and the programming of adult disease: a review. *J Hum Nutr Diet Off J Br Diet Assoc*. Januar 2015;28 Suppl 1:1–14.
4. Dörner G. Problems and terminology of functional teratology. *Acta Biol Med Ger*. 1975;34(6):1093–5.
5. Plagemann A, Harder T, Schellong K, Rodekamp E, Dudenhausen JW. [Fetal programming by disturbed intrauterine environment - fundamental mechanisms exemplified by the regulation of body weight and metabolism]. *Gynäkol-Geburtshilfliche Rundsch*. 2008;48(4):215–24.
6. Barker DJP. Fetal origins of coronary heart disease. *BMJ*. 15. Juli 1995;311(6998):171–4.
7. Barker DJ, Osmond C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet*. 10. Mai 1986;1(8489):1077–81.
8. de Boo HA, Harding JE. The developmental origins of adult disease (Barker) hypothesis. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*. Februar 2006;46(1):4–14.
9. Forsdahl A. Are poor living conditions in childhood and adolescence an important risk factor for arteriosclerotic heart disease? *Br J Prev Soc Med*. Juni 1977;31(2):91–5.
10. Eriksson JG, Forsén T, Tuomilehto J, Osmond C, Barker DJP. Early growth and coronary heart disease in later life: longitudinal study. *BMJ*. 21. April 2001;322(7292):949–53.
11. Drake AJ, Walker BR. The intergenerational effects of fetal programming: non-genomic mechanisms for the inheritance of low birth weight and cardiovascular risk. *J Endocrinol*. Januar 2004;180(1):1–16.
12. Hales CN, Barker DJ, Clark PM, Cox LJ, Fall C, Osmond C, u. a. Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. *BMJ*. 26. Oktober 1991;303(6809):1019–22.
13. Barker DJ, Osmond C, Meade TW. Early growth and clotting factors in adult life. *BMJ*. 18. April 1992;304(6833):1052.



14. Fall CH, Barker DJ, Osmond C, Winter PD, Clark PM, Hales CN. Relation of infant feeding to adult serum cholesterol concentration and death from ischaemic heart disease. *BMJ*. 28. März 1992;304(6830):801–5.
15. Roseboom TJ, van der Meulen JHP, Ravelli ACJ, Osmond C, Barker DJP, Bleker OP. Effects of prenatal exposure to the Dutch famine on adult disease in later life: an overview. *Mol Cell Endocrinol*. 20. Dezember 2001;185(1–2):93–8.
16. Barker DJ, Osmond C, Simmonds SJ, Wield GA. The relation of small head circumference and thinness at birth to death from cardiovascular disease in adult life. *BMJ*. 13. Februar 1993;306(6875):422–6.
17. Benediktsson R, Lindsay RS, Noble J, Seckl JR, Edwards CR. Glucocorticoid exposure in utero: new model for adult hypertension. *Lancet*. 6. Februar 1993;341(8841):339–41.
18. de Steenwinkel FDO, Hokken-Koelega ACS, de Man YA, de Rijke YB, de Ridder MAJ, Hazes JMW, u. a. Circulating maternal cytokines influence fetal growth in pregnant women with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 21. Dezember 2012;
19. Pfab T, Slowinski T, Godes M, Halle H, Priem F, Hocher B. Low birth weight, a risk factor for cardiovascular diseases in later life, is already associated with elevated fetal glycosylated hemoglobin at birth. *Circulation*. 17. Oktober 2006;114(16):1687–92.
20. Ahmad MO, Kalsoom U, Sughra U, Hadi U, Imran M. Effect of maternal anaemia on birth weight. *J Ayub Med Coll Abbottabad JAMC*. März 2011;23(1):77–9.
21. Carr-Hill R, Campbell DM, Hall MH, Meredith A. Is birth weight determined genetically? *Br Med J Clin Res Ed*. 19. September 1987;295(6600):687–9.
22. Pearce W. Hypoxic regulation of the fetal cerebral circulation. *J Appl Physiol*. 1. Februar 2006;100(2):731–8.
23. Hales CN, Barker DJP. The thrifty phenotype hypothesis Type 2 diabetes. *Br Med Bull*. 11. Januar 2001;60(1):5–20.
24. Mirbahai L, Chipman JK. Epigenetic memory of environmental organisms: A reflection of lifetime stressor exposures. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen*. April 2014;764–765:10–7.
25. Jin B, Li Y, Robertson KD. DNA Methylation. *Genes Cancer*. Juni 2011;2(6):607–17.
26. Robertson KD. DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet*. August 2005;6(8):597–610.

27. Cedar H. DNA methylation and gene activity. *Cell*. 8. April 1988;53(1):3–4.
28. Holliday R, Pugh JE. DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science*. 24. Januar 1975;187(4173):226–32.
29. Ehrlich M, Gama-Sosa MA, Huang LH, Midgett RM, Kuo KC, McCune RA, u. a. Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. *Nucleic Acids Res*. 24. April 1982;10(8):2709–21.
30. Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet*. 1. März 2003;33:245–54.
31. Heijmans BT, Tobi EW, Stein AD, Putter H, Blauw GJ, Susser ES, u. a. Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 4. November 2008;105(44):17046–9.
32. Radtke KM, Ruf M, Gunter HM, Dohrmann K, Schauer M, Meyer A, u. a. Transgenerational impact of intimate partner violence on methylation in the promoter of the glucocorticoid receptor. *Transl Psychiatry*. Juli 2011;1(7):e21.
33. Gluckman PD, Hanson MA, Bateson P, Beedle AS, Law CM, Bhutta ZA, u. a. Towards a new developmental synthesis: adaptive developmental plasticity and human disease. *Lancet*. 9. Mai 2009;373(9675):1654–7.
34. Gabory A, Attig L, Junien C. Developmental programming and epigenetics. *Am J Clin Nutr*. 1. Dezember 2011;94(6 Suppl):1943S-1952S.
35. Vaissière T, Sawan C, Hecceg Z. Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing. *Mutat Res Mutat Res*. Juli 2008;659(1–2):40–8.
36. Rangel M, dos Santos JC, Ortiz PHL, Hirata M, Jasiulionis MG, Araujo RC, u. a. Modification of epigenetic patterns in low birth weight children: importance of hypomethylation of the ACE gene promoter. *PloS One*. 2014;9(8):e106138.
37. Bogdarina I, Welham S, King PJ, Burns SP, Clark AJL. Epigenetic Modification of the Renin-Angiotensin System in the Fetal Programming of Hypertension. *Circ Res*. 3. Februar 2007;100(4):520–6.
38. Lumbers ER, Pringle KG. Roles of the circulating renin-angiotensin-aldosterone system in human pregnancy. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol*. 15. Januar 2014;306(2):R91–101.

39. Tigerstedt R, Bergman PQ. Niere und Kreislauf. *Skand Arch Für Physiol*. 1898;8(1):223–71.
40. Paul M, Mehr AP, Kreutz R. Physiology of Local Renin-Angiotensin Systems. *Physiol Rev*. July 2006 vol. 86 no. 3 747-803.
41. Deschepper CF. Angiotensinogen: hormonal regulation and relative importance in the generation of angiotensin II. *Kidney Int*. Dezember 1994;46(6):1561–3.
42. Persson PB, Skälweit A, Thiele BJ. Controlling the release and production of renin. *Acta Physiol Scand*. August 2004;181(4):375–81.
43. Quinn SJ, Williams GH. Regulation of Aldosterone Secretion. *Annu Rev Physiol*. 1988;50(1):409–26.
44. Hollenberg NK, Williams GH. Angiotensin as a renal, adrenal, and cardiovascular hormone: responses to saralasin in normal man and in essential and secondary hypertension. *Kidney Int Suppl*. März 1979;(9):S29-35.
45. Griffin SA, Brown WC, MacPherson F, McGrath JC, Wilson VG, Korsgaard N, u. a. Angiotensin II causes vascular hypertrophy in part by a non-pressor mechanism. *Hypertension*. Mai 1991;17(5):626–35.
46. Dzau VJ, Gibbons GH, Pratt RE. Molecular mechanisms of vascular renin-angiotensin system in myointimal hyperplasia. *Hypertension*. Oktober 1991;18(4 Suppl):III100-105.
47. Weber KT, Sun Y, Campbell SE. Structural remodelling of the heart by fibrous tissue: Role of circulating hormones and locally produced peptides. *Eur Heart J*. 2. Dezember 1995;16(suppl N):12–8.
48. Li X, Shams M, Zhu J, Khalig A, Wilkes M, Whittle M, u. a. Cellular localization of AT1 receptor mRNA and protein in normal placenta and its reduced expression in intrauterine growth restriction. Angiotensin II stimulates the release of vasorelaxants. *J Clin Invest*. 15. Januar 1998;101(2):442–54.
49. Thomas WG, Mendelsohn FAO. Angiotensin receptors: form and function and distribution. *Int J Biochem Cell Biol*. Juni 2003;35(6):774–9.
50. Tower CL, Lui S, Charlesworth NR, Smith SD, Aplin JD, Jones RL. Differential expression of angiotensin II type 1 and type 2 receptors at the maternal-fetal interface: potential roles in early placental development. *Reprod Camb Engl*. Dezember 2010;140(6):931–42.
51. Cooper AC, Robinson G, Vinson GP, Cheung WT, Broughton Pipkin F. The localization and

- expression of the renin-angiotensin system in the human placenta throughout pregnancy. *Placenta*. August 1999;20(5–6):467–74.
52. Hagemann A, Nielsen AH, Poulsen K. The uteroplacental renin-angiotensin system: a review. *Exp Clin Endocrinol*. 1994;102(3):252–61.
  53. Mistry HD, Kurlak LO, Broughton Pipkin F. The placental renin–angiotensin system and oxidative stress in pre-eclampsia. *Placenta*. 1. Februar 2013;34(2):182–6.
  54. Williams PJ, Mistry HD, Innes BA, Bulmer JN, Broughton Pipkin F. Expression of AT1R, AT2R and AT4R and Their Roles in Extravillous Trophoblast Invasion in the Human. *Placenta*. 1. Mai 2010;31(5):448–55.
  55. Immonen I, Siimes A, Stenman UH, Kärkkäinen J, Fyhrquist F. Plasma renin substrate and oestrogens in normal pregnancy. *Scand J Clin Lab Invest*. Februar 1983;43(1):61–5.
  56. Lin SY, Goodfriend TL. Angiotensin receptors. *Am J Physiol*. Mai 1970;218(5):1319–28.
  57. Goodfriend TL, Ball DL, Farley DB. Radioimmunoassay of angiotensin. *J Lab Clin Med*. Oktober 1968;72(4):648–62.
  58. Papadimitriou A, Worcel M. Dose-response curves for angiotensin II and synthetic analogues in three types of smooth muscle. *Br J Pharmacol*. Februar 1974;50(2):291–7.
  59. Peach MJ, Levens NR. Molecular approaches to the study of angiotensin receptors. *Adv Exp Med Biol*. 1980;130:171–94.
  60. Trachte GJ, Ackerly JA, Peach MJ. Inotropic cardiac and vascular actions of [Ala7]angiotensin analogs. *J Cardiovasc Pharmacol*. August 1981;3(4):838–46.
  61. Miyata N, Park F, Li XF, Cowley AW Jr. Distribution of angiotensin AT1 and AT2 receptor subtypes in the rat kidney. *Am J Physiol*. September 1999;277(3 Pt 2):F437–446.
  62. de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev*. September 2000;52(3):415–72.
  63. Takeda-Matsubara Y, Iwai M, Cui T-X, Shiuchi T, Liu H-W, Okumura M, u. a. Roles of angiotensin type 1 and 2 receptors in pregnancy-associated blood pressure change. *Am J Hypertens*. August 2004;17(8):684–9.
  64. Carey RM, Wang Z-Q, Siragy HM. Role of the Angiotensin Type 2 Receptor in the Regulation of Blood Pressure and Renal Function. *Hypertension*. 1. Januar 2000;35(1):155–63.
  65. Kambayashi Y, Bardhan S, Takahashi K, Tsuzuki S, Inui H, Hamakubo T, u. a. Molecular

- cloning of a novel angiotensin II receptor isoform involved in phosphotyrosine phosphatase inhibition. *J Biol Chem.* 25. November 1993;268(33):24543–6.
66. Mukoyama M, Nakajima M, Horiuchi M, Sasamura H, Pratt RE, Dzau VJ. Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors. *J Biol Chem.* 1993;268(33):24539–42.
  67. Danyel LA, Schmerler P, Paulis L, Unger T, Steckelings UM. Impact of AT<sub>2</sub>-receptor stimulation on vascular biology, kidney function, and blood pressure. *Integr Blood Press Control.* 2013;6:153–61.
  68. Li H, Qi Y, Li C, Braseth LN, Gao Y, Shabashvili AE, u. a. Angiotensin type 2 receptor-mediated apoptosis of human prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther.* 12. Januar 2009;8(12):3255–65.
  69. Lemarié CA, Schiffrin EL. The angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular disease. *J Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst JRAAS.* März 2010;11(1):19–31.
  70. Guimond M-O, Gallo-Payet N. How does angiotensin AT<sub>2</sub> receptor activation help neuronal differentiation and improve neuronal pathological situations? *Front Endocrinol.* 2012;3:164.
  71. AbdAlla S, Lothar H, Abdel-tawab AM, Quitterer U. The angiotensin II AT<sub>2</sub> receptor is an AT<sub>1</sub> receptor antagonist. *J Biol Chem.* 26. Oktober 2001;276(43):39721–6.
  72. Gao L, Zucker IH. AT<sub>2</sub> receptor signaling and sympathetic regulation. *Curr Opin Pharmacol.* April 2011;11(2):124–30.
  73. Mehta PK, Griendling KK. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol.* Januar 2007;292(1):C82-97.
  74. Förstermann U, Münzel T. Endothelial Nitric Oxide Synthase in Vascular Disease From Marvel to Menace. *Circulation.* 4. April 2006;113(13):1708–14.
  75. Tsutsui M, Shimokawa H, Otsuji Y, Ueta Y, Sasaguri Y, Yanagihara N. Nitric Oxide Synthases and Cardiovascular Diseases. *Circ J.* 2009;73(6):986–93.
  76. Inagami T, Kitami Y. Angiotensin II Receptor: Molecular Cloning, Functions, and Regulation. *Hypertens Res.* 1994;17(2):87–97.
  77. Ozono R, Wang Z-Q, Moore AF, Inagami T, Siragy HM, Carey RM. Expression of the Subtype 2 Angiotensin (AT<sub>2</sub>) Receptor Protein in Rat Kidney. *Hypertension.* 11. Januar 1997;30(5):1238–46.

78. Grady EF, Sechi LA, Griffin CA, Schambelan M, Kalinyak JE. Expression of AT<sub>2</sub> receptors in the developing rat fetus. *J Clin Invest.* September 1991;88(3):921–33.
79. Horiuchi M, Hayashida W, Kambe T, Yamada T, Dzau VJ. Angiotensin Type 2 Receptor Dephosphorylates Bcl-2 by Activating Mitogen-activated Protein Kinase Phosphatase-1 and Induces Apoptosis. *J Biol Chem.* 25. Juli 1997;272(30):19022–6.
80. Chang S-Y, Chen Y-W, Chenier I, Tran SLM, Zhang S-L. Angiotensin II type II receptor deficiency accelerates the development of nephropathy in type I diabetes via oxidative stress and ACE2. *Exp Diabetes Res.* 2011;2011:521076.
81. Burrell JH, Lumbers ER. Angiotensin receptor subtypes in the uterine artery during ovine pregnancy. *Eur J Pharmacol.* 9. Juli 1997;330(2–3):257–67.
82. Stevens AD, Lumbers ER. The effects of long-term infusions of angiotensin II into the pregnant ewe on uterine blood flow and on the fetus. *J Cardiovasc Pharmacol.* Dezember 1999;34(6):824–30.
83. Cornock R, Langley-Evans SC, Mobasheri A, McMullen S. The impact of maternal protein restriction during rat pregnancy upon renal expression of angiotensin receptors and vasopressin-related aquaporins. *Reprod Biol Endocrinol RBE.* 2010;8:105.
84. Musha Y, Itoh S, Miyakawa M, Ohtsuji M, Hanson MA, Kinoshita K, u. a. Vascular, renal and placental effects on pregnant offspring of protein-restricted rat dams. *J Obstet Gynaecol Res.* April 2011;37(4):343–51.
85. Sahajpal V, Ashton N. Increased glomerular angiotensin II binding in rats exposed to a maternal low protein diet in utero. *J Physiol.* 15. Februar 2005;563(Pt 1):193–201.
86. Mesquita FF, Gontijo J a. R, Boer PA. Maternal undernutrition and the offspring kidney: from fetal to adult life. *Braz J Med Biol Res.* November 2010;43(11):1010–8.
87. Gilbert JS, Lang AL, Grant AR, Nijland MJ. Maternal nutrient restriction in sheep: hypertension and decreased nephron number in offspring at 9 months of age. *J Physiol.* 15. Mai 2005;565(Pt 1):137–47.
88. Vehaskari VM, Stewart T, Lafont D, Soyez C, Seth D, Manning J. Kidney angiotensin and angiotensin receptor expression in prenatally programmed hypertension. *Am J Physiol - Ren Physiol.* 8. Januar 2004;287(2):F262–7.
89. Lamparter S, Sun Y, Weber KT. Angiotensin II receptor blockade during gestation attenuates collagen formation in the developing rat heart. *Cardiovasc Res.* Juli 1999;43(1):165–72.

90. Petla LT, Chikkala R, Ratnakar KS, Kodati V, Sritharan V. Biomarkers for the management of pre-eclampsia in pregnant women. *Indian J Med Res.* Juli 2013;138(1):60–7.
91. Judson JP, Nadarajah VD, Bong YC, Subramaniam K, Sivalingam N. A preliminary finding: immunohistochemical localisation and distribution of placental angiotensin II receptor subtypes in normal and preeclamptic pregnancies. *Med J Malaysia.* Juni 2006;61(2):173–80.
92. Trauner M, Fickert P, Pertl B. Schwangerschaftsspezifische Lebererkrankungen. *Dtsch Arztebl Int.* 2004;101(50):3416-.
93. Wang A, Rana S, Karumanchi SA. Preeclampsia: the role of angiogenic factors in its pathogenesis. *Physiol Bethesda Md.* Juni 2009;24:147–58.
94. Irani RA, Xia Y. The Functional Role of the Renin-Angiotensin System in Pregnancy and Preeclampsia. *Placenta.* September 2008;29(9):763–71.
95. Merrill DC, Karoly M, Chen K, Ferrario CM, Brosnihan KB. Angiotensin-(1-7) in normal and preeclamptic pregnancy. *Endocrine.* August 2002;18(3):239–45.
96. Wallukat G, Homuth V, Fischer T, Lindschau C, Horstkamp B, Jüpner A, u. a. Patients with preeclampsia develop agonistic autoantibodies against the angiotensin AT1 receptor. *J Clin Invest.* April 1999;103(7):945–52.
97. Lumbers ER, Pringle KG. Roles of the circulating renin-angiotensin-aldosterone system in human pregnancy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 15. Januar 2014;306(2):R91-101.
98. Davies DP. Size at birth and growth in the first year of life of babies who are overweight and underweight at birth. *Proc Nutr Soc.* Februar 1980;39(1):25–33.
99. Finster M, Wood M. The Apgar Score Has Survived the Test of Time. *Anesthesiol J Am Soc Anesthesiol.* 1. April 2005;102(4):855–7.
100. Pong Chan W, Lung Fung M, Nobiling R, Sing Leung P. Activation of local renin-angiotensin system by chronic hypoxia in rat pancreas. *Mol Cell Endocrinol.* 25. Februar 2000;160(1–2):107–14.
101. Mao C, Hou J, Ge J, Hu Y, Ding Y, Zhou Y, u. a. Changes of renal AT1/AT2 receptors and structures in ovine fetuses following exposure to long-term hypoxia. *Am J Nephrol.* 2010;31(2):141–50.
102. Su J-Z, Fukuda N, Jin X-Q, Lai Y-M, Suzuki R, Tahira Y, u. a. Effect of AT2 receptor on expression of AT1 and TGF-beta receptors in VSMCs from SHR. *Hypertension.* Dezember

2002;40(6):853–8.

- 103.** Xu Y, Menon V, Jugdutt BI. Cardioprotection after angiotensin II type 1 blockade involves angiotensin II type 2 receptor expression and activation of protein kinase C-epsilon in acutely reperfused myocardial infarction in the dog. Effect of UP269-6 and losartan on AT1 and AT2-receptor expression and IP3 receptor and PKCepsilon proteins. *J Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst JRAAS*. Juni 2000;1(2):184–95.
- 104.** Williams PJ, Mistry HD, Innes BA, Bulmer JN, Broughton Pipkin F. Expression of AT1R, AT2R and AT4R and their roles in extravillous trophoblast invasion in the human. *Placenta*. Mai 2010;31(5):448–55.
- 105.** Kalenga MK, de Gasparo M, Whitebread S, Vankrieken L, Thomas K, De Hertogh R. [Identification of angiotensin II receptor and determination of its subtypes in rabbit and guinea pig fetal tissue]. *Reprod Nutr Dev*. 1992;32(1):47–54.
- 106.** Schauser KH, Nielsen AH, Winther H, Dantzer V, Poulsen K. Autoradiographic Localization and Characterization of Angiotensin II Receptors in the Bovine Placenta and Fetal Membranes. *Biol Reprod*. 9. Januar 1998;59(3):684–92.
- 107.** Benjamin N, Rymer J, Todd SD, Thom M, Ritter JM. Sensitivity to angiotensin II of forearm resistance vessels in pregnancy. *Br J Clin Pharmacol*. Oktober 1991;32(4):523–5.
- 108.** Massani ZM, Sanguinetti R, Gallegos R, Raimondi D. Angiotensin blood levels in normal and toxemic pregnancies. *Am J Obstet Gynecol*. 1. Oktober 1967;99(3):313–7.
- 109.** Wilson M, Morganti AA, Zervoudakis I, Letcher RL, Romney BM, Oeyon PV, u. a. Blood pressure, the renin-aldosterone system and sex steroids throughout normal pregnancy. *Am J Med*. 1. Januar 1980;68(1):97–104.
- 110.** Gant NF, Worley RJ, Everett RB, MacDonald PC. Control of vascular responsiveness during human pregnancy. *Kidney Int*. 1. August 1980;18(2):253–8.
- 111.** Gant NF, Daley GL, Chand S, Whalley PJ, MacDonald PC. A study of angiotensin II pressor response throughout primigravid pregnancy. *J Clin Invest*. November 1973;52(11):2682–9.
- 112.** AbdAlla S, Lother H, el Massiery A, Quitterer U. Increased AT1 receptor heterodimers in preeclampsia mediate enhanced angiotensin II responsiveness. *Nat Med*. September 2001;7(9):1003–9.
- 113.** Sullivan JA, Rupnow HL, Cale JM, Magness RR, Bird IM. Pregnancy and ovarian steroid regulation of angiotensin II type 1 and type 2 receptor expression in ovine uterine artery



endothelium and vascular smooth muscle. *Endothel J Endothel Cell Res.* April 2005;12(1–2):41–56.

114. Brede M, Hadamek K, Meinel L, Wiesmann F, Peters J, Engelhardt S, u. a. Vascular hypertrophy and increased P70S6 kinase in mice lacking the angiotensin II AT(2) receptor. *Circulation.* 20. November 2001;104(21):2602–7.
115. Barber MN, Sampey DB, Widdop RE. AT2 Receptor Stimulation Enhances Antihypertensive Effect of AT1 Receptor Antagonist in Hypertensive Rats. *Hypertension.* 11. Januar 1999;34(5):1112–6.
116. Sherman RC, Langley-Evans SC. Antihypertensive treatment in early postnatal life modulates prenatal dietary influences upon blood pressure in the rat. *Clin Sci Lond Engl* 1979. März 2000;98(3):269–75.
117. Knock GA, Sullivan MH, McCarthy A, Elder MG, Polak JM, Wharton J. Angiotensin II (AT1) vascular binding sites in human placentae from normal-term, preeclamptic and growth retarded pregnancies. *J Pharmacol Exp Ther.* November 1994;271(2):1007–15.
118. Alwasel SH, Kaleem I, Sahajpal V, Ashton N. Maternal protein restriction reduces angiotensin II AT(1) and AT(2) receptor expression in the fetal rat kidney. *Kidney Blood Press Res.* 2010;33(4):251–9.
119. Červenka L, Bíbová J, Husková Z, Vaňourková Z, Kramer HJ, Herget J, u. a. Combined suppression of the intrarenal and circulating vasoconstrictor renin-ACE-ANG II axis and augmentation of the vasodilator ACE2-ANG 1-7-Mas axis attenuates the systemic hypertension in Ren-2 transgenic rats exposed to chronic hypoxia. *Physiol Res.* 2015;64(1):11–24.
120. Sun N-L, Wang L-Y, Xi Y, Hu Q-Z. Effect of renin-angiotensin system on arterial function in persons with acute mountain sickness. *Int J Cardiol.* 20. August 2013;167(4):1641–2.
121. Kurlak LO, Mistry HD, Cindrova-Davies T, Burton GJ, Broughton Pipkin F. Human placental renin-angiotensin system in normotensive and pre-eclamptic pregnancies at high altitude and after acute hypoxia-reoxygenation insult. *J Physiol.* 1. März 2016;594(5):1327–40.
122. Cuffe JSM, Walton SL, Steane SE, Singh RR, Simmons DG, Moritz KM. The effects of gestational age and maternal hypoxia on the placental renin angiotensin system in the mouse. *Placenta.* November 2014;35(11):953–61.
123. Casey DP, Joyner MJ. Compensatory vasodilatation during hypoxic exercise: mechanisms responsible for matching oxygen supply to demand. *J Physiol.* 15. Dezember

2012;590(24):6321–6.

- 124.** Swenson ER. Hypoxia and Its Acid-Base Consequences: From Mountains to Malignancy. *Adv Exp Med Biol.* 2016;903:301–23.
- 125.** Henger A, Tutt P, Riesen WF, Hulter HN, Krapf R. Acid-base and endocrine effects of aldosterone and angiotensin II inhibition in metabolic acidosis in human patients. *J Lab Clin Med.* November 2000;136(5):379–89.
- 126.** ACOG: Proteinuria No Longer Necessary for Preeclampsia Diagnosis. *NEJM J Watch* [Internet]. 15. November 2013 [zitiert 6. August 2014];2013. Verfügbar unter: <http://www.jwatch.org/fw108159/2013/11/15/acog-proteinuria-no-longer-necessary-preeclampsia>
- 127.** Sibai BM, Stella CL. Diagnosis and management of atypical preeclampsia-eclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* Mai 2009;200(5):481.e1-7.
- 128.** American College of Obstetricians and Gynecologists, Task Force on Hypertension in Pregnancy. Hypertension in pregnancy. Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists' Task Force on Hypertension in Pregnancy. *Obstet Gynecol.* November 2013;122(5):1122–31.
- 129.** Kucukgoz Gulec U, Tuncay Ozgunen F, Buyukkurt S, Baris Guzel A, Ferhat Urunsak I, Cansun Demir S, u. a. Comparison of Clinical and Laboratory Findings in Early- and Late- Onset Preeclampsia. *J Matern-Fetal Neonatal Med Off J Eur Assoc Perinat Med Fed Asia Ocean Perinat Soc Int Soc Perinat Obstet.* 18. Februar 2013;
- 130.** Liao M-C, Zhao X-P, Chang S-Y, Lo C-S, Chenier I, Takano T, u. a. AT2 R deficiency mediated podocyte loss via activation of ectopic hedgehog interacting protein (Hhip) gene expression. *J Pathol.* 2017;243(3):279–93.
- 131.** Kawachi H, Han GD, Miyauchi N, Hashimoto T, Suzuki K, Shimizu F. Therapeutic targets in the podocyte: findings in anti-slit diaphragm antibody-induced nephropathy. *J Nephrol.* August 2009;22(4):450–6.
- 132.** Deen WM. What determines glomerular capillary permeability? *J Clin Invest.* November 2004;114(10):1412–4.
- 133.** Neutralization of Circulating Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) by Anti-VEGF Antibodies and Soluble VEGF Receptor 1 (sFlt-1) Induces Proteinuria [Internet]. [zitiert 5. Mai 2019]. Verfügbar unter:

[http://www.jbc.org/content/278/15/12605?ijkey=1431a33e0524cb02de86562927de2d8589c8589a&keytype2=tf\\_ipsecsha](http://www.jbc.org/content/278/15/12605?ijkey=1431a33e0524cb02de86562927de2d8589c8589a&keytype2=tf_ipsecsha)

- 134.** Garovic VD, Wagner SJ, Petrovic LM, Gray CE, Hall P, Sugimoto H, u. a. Glomerular expression of nephrin and synaptopodin, but not podocin, is decreased in kidney sections from women with preeclampsia. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* April 2007;22(4):1136–43.
- 135.** Mii A, Shimizu A, Masuda Y, Ishizaki M, Kawachi H, Iino Y, u. a. Angiotensin II receptor blockade inhibits acute glomerular injuries with the alteration of receptor expression. *Lab Investig J Tech Methods Pathol.* Februar 2009;89(2):164–77.
- 136.** Venkatesha S, Toporsian M, Lam C, Hanai J, Mammoto T, Kim YM, u. a. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat Med.* 1. Juni 2006;12(6):642–9.
- 137.** Chen K, Mehta JL, Li D, Joseph L, Joseph J. Transforming growth factor beta receptor endoglin is expressed in cardiac fibroblasts and modulates profibrogenic actions of angiotensin II. *Circ Res.* 10. Dezember 2004;95(12):1167–73.
- 138.** Deelman LE, Navis G, de Boer E, Wietes M, de Zeeuw D, Henning RH. Role of proteinuria in the regulation of renal renin-angiotensin system components in unilateral proteinuric rats. *J Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst JRAAS.* März 2003;4(1):38–42.
- 139.** Tejera N, Gómez-Garre D, Lázaro A, Gallego-Delgado J, Alonso C, Blanco J, u. a. Persistent Proteinuria Up-Regulates Angiotensin II Type 2 Receptor and Induces Apoptosis in Proximal Tubular Cells. *Am J Pathol.* Mai 2004;164(5):1817–26.
- 140.** McArdle A, Maduwegedera D, Moritz K, Flower RL, Denton KM, Roberts CT. Chronic maternal hypertension affects placental gene expression and differentiation in rabbits. *J Hypertens.* Mai 2010;28(5):959–68.
- 141.** Shah DM. Role of the renin-angiotensin system in the pathogenesis of preeclampsia. *Am J Physiol Renal Physiol.* April 2005;288(4):F614-625.
- 142.** Ferrer RL, Sibai BM, Mulrow CD, Chiquette E, Stevens KR, Cornell J. Management of mild chronic hypertension during pregnancy: a review. *Obstet Gynecol.* November 2000;96(5 Pt 2):849–60.
- 143.** Williams PJ, Mistry HD, Innes BA, Bulmer JN, Broughton Pipkin F. Expression of AT1R, AT2R and AT4R and Their Roles in Extravillous Trophoblast Invasion in the Human. Placenta. 1. Mai 2010;31(5):448–55.

## 6 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Christian Krause, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

Untersuchung zu Zusammenhängen der humanen plazentaren Angiotensin-II-Typ-2 Rezeptor Konzentration mit Markern der fetalen Programmierung und der Präeklampsie

Analysis of the relationship between human placental angiotensin II type 2 receptor concentration and markers of fetal programming and preeclampsia

selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

---

Datum

---

Unterschrift

## **7 Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.



## 8 Danksagung

Ich möchte in erster Linie PD Dr. med. Philipp Kalk für die wertvolle Unterstützung bei der Vollendung der Arbeit danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Christoph Reichetzer für sein geduldiges Engagement bei der Korrektur der Arbeit. Ich habe seine wertvollen Ratschläge und Anregungen sehr geschätzt. Besonderer Dank gilt auch Herrn Dipl. ing. Jan Rahnenführer für seine bedeutende Unterstützung während der experimentellen Phase der Arbeit.

Ich bedanke mich sehr herzlich bei Prof. Dr. med. Hoher für die Vergabe des Themas und damit die Ermöglichung dieser Dissertation.

Des Weiteren bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern am CCR, die ich Rahmen dieser Arbeit kennengelernt habe für die angenehme Atmosphäre und Unterstützung.

Ich bedanke mich bei allen Freunden und Familienmitgliedern, insbesondere meinem Onkel Andre Hoffmann, die mich motiviert haben, immer wieder Interesse zeigten sowie meiner Ehefrau Dr. Dr. med. Miroslava Valentova, die mir stets mit konstruktiver Kritik zur Seite stand.

# 9 Bescheinigung Statistik



CharitéCentrum für Human- und Gesundheitswissenschaften

Charité | Campus Charité Mitte | 10117 Berlin

Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie (iBiKE)

Direktor: Prof. Dr. Geraldine Rauch

Postanschrift:  
Charitéplatz 1 | 10117 Berlin  
Besucheranschrift:  
Reinhardtstr. 58 | 10117 Berlin  
Tel. +49 (0)30 450 562171  
geraldine.rauch@charite.de  
<https://biometrie.charite.de/>



**Name, Vorname:** Krause, Christian  
**Emailadresse:** christian.krause@charite.de  
**Matrikelnummer:** 207873  
**PromotionsbetreuerIn:** PD Dr. med. Philipp Kalk  
**Promotionsinstitution / Klinik:** Charite center for cardiovascular research

## Bescheinigung

Hiermit bescheinige ich, dass Herr / Frau *Vorname Name* innerhalb der Service Unit Biometrie des Instituts für Biometrie und klinische Epidemiologie (iBiKE) bei mir eine statistische Beratung zu einem Promotionsvorhaben wahrgenommen hat. Folgende Beratungstermine wurden wahrgenommen:

- Termin 1: 02.02.2022

Folgende wesentliche Ratschläge hinsichtlich einer sinnvollen Auswertung und Interpretation der Daten wurden während der Beratung erteilt:

- Verwendete Methoden beschreiben / hinschreiben, was gemacht wurde
- Bei Darstellung der Tabellen und Ergebnissen an Publikationen orientieren
- Es wurde nicht für multiples Testen adjustiert, entsprechend haben die Resultate nur explorativen Charakter

Diese Bescheinigung garantiert nicht die richtige Umsetzung der in der Beratung gemachten Vorschläge, die korrekte Durchführung der empfohlenen statistischen Verfahren und die richtige Darstellung und Interpretation der Ergebnisse. Die Verantwortung hierfür obliegt allein dem Promovierenden. Das Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie übernimmt hierfür keine Haftung.

Datum:

Name des Beraters/ der Beraterin:



Unterschrift BeraterIn, Institutsstempel

